



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**



**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN  
DE GRANOS DE POLEN EN SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)  
EN LA ZONA DE BELLO HORIZONTE, DISTRITO DE LA BANDA DE  
SHILCAYO - REGION SAN MARTÍN**

**PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
MANUEL YAMPAOLO RISCO VARGAS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**TARAPOTO – PERÚ**

**2008**

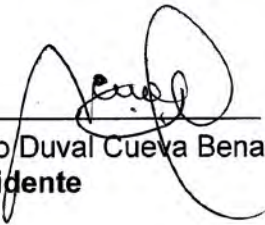
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL**  
**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**  
**ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS**

**TESIS:**


**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN  
DE GRANOS DE POLEN EN SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)  
EN LA ZONA DE BELLO HORIZONTE, DISTRITO DE LA BANDA DE  
SHILCAYO - REGION SAN MARTÍN**

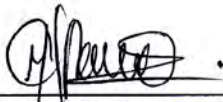
**PRESENTADO POR EL BACHILLER:  
MANUEL YAMPAOLO RISCO VARGAS**

**MIEMBROS DEL JURADO**

  
Ing. M.Sc. Armando Duval Cueva Benavides  
**Presidente**

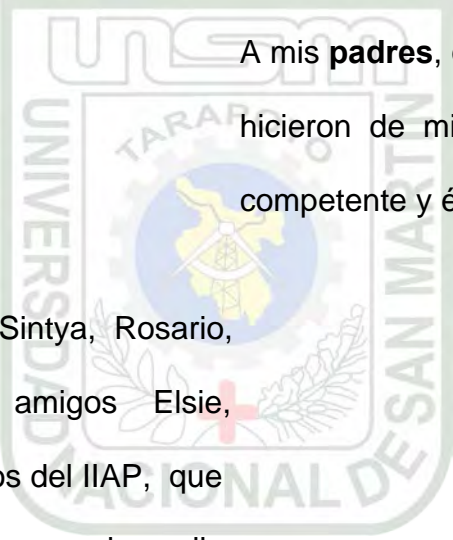
  
Ing. M.Sc. Guillermo Vásquez Ramírez  
**Secretario**

  
Ing. M.Sc. Javier Ormeño Luna  
**Miembro**

  
Ing. María Emilia Ruíz Sánchez  
**Asesor**

## DEDICATORIA

Al **todopoderoso** que siempre estuvo pendiente de mi accionar y mis pasos guiándome con mucha fuerza y esperanza en mi vida diaria.



A mis **padres**, que con gran esfuerzo hicieron de mí un profesional muy competente y exitoso.

A mis **hermanas** María, Sintya, Rosario, Liliam y Katty a mis amigos Elsie, Roberto, Boris, Ney y a los del IIAP, que con su alegría y ganas de salir adelante me dieron el apoyo moral y espiritual para lograr mis objetivos.

A mis **abuelitos** Amadeo y Yolanda a mis tíos sus esposas e hijos, los cuáles siempre me estuvieron aconsejando y alentando a llegar a la meta con acciones y ejemplos de lucha constante por ser base fundamental para el éxito.

## AGRADECIMIENTO

- ♣ Al **Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP)**, con la Gerencia del Ing. M.Sc. **Luís Arévalo López** por todo el apoyo brindado y facilitar las instalaciones para el presente trabajo.
- ♣ A la **Ing. María Emilia Ruiz Sánchez**, que exitosamente viene dirigiendo el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, y a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, que contribuyeron a mi formación profesional.
- ♣ Al Ing. **Danter Cachique Huansi**, mentor del presente trabajo de investigación, por compartir sus enseñanzas, tiempo y dedicación para con la presente.
- ♣ Al Ing. **Juan Carlos Guerrero Abad, Co - asesor** del presente trabajo de investigación, por los buenos consejos y aportes los cuales contribuyeron en guiarme con mucha exactitud a lograr buenos resultados y poder cumplir con los objetivos y metas del presente trabajo de investigación.
- ♣ Al Ing. **Henry Delgado Haya** al Blgo. **Marco Antonio León Martínez** y a los técnicos Henry Vera, Cesar Díaz, por las enseñanzas aprendidas bajo su orientación los cuales fueron aportes muy valiosos a dicho trabajo.
- ♣ A mis amigos del IIAP, **Mar Asunción, Carlos Lozano** y **David de la Cruz** los cuales me apoyaron en todo momento incondicionalmente.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. Aspectos Generales del Cultivo de Sacha inchi	3
3.1.1. Origen y distribución	3
3.1.2. Clasificación taxonómica	3
3.1.3. Descripción botánica	4
3.2. De los Métodos de Recolección y Conservación de Granos de Polen	5
3.2.1. Polen	5
3.2.2. Etapas de desarrollo de la flor estaminada y flor postilada	7
3.2.3. Colección y preparación del polen	7
3.2.4. Conservación de los granos de polen	12
3.2.4.1. Conservación a corto plazo	13
3.2.4.2. Conservación a mediano plazo	13
3.2.4.3. Conservación a largo plazo	14
3.3. Selección de Frascos para Conservación	15
3.4. Banco de Polen	16
3.5. Caracterización del Grano de Polen	16
3.5.1. Forma	16
3.5.2. Tamaño	17
3.6. Evaluación de Viabilidad del Grano de Polen	18
3.7. Conteo de Granos de Polen	19
IV. MATERIALES Y METODOS	21
4.1. Materiales	21
4.1.1. Materiales de vidrio de laboratorio	21
4.1.2. Materiales de plástico y metal de laboratorio	21
4.1.3. Equipos de laboratorio	22
4.1.4. Reactivos de laboratorio	22
4.2. Metodología	23
4.2.1. Ubicación del experimento	23

4.2.2. Diseño experimental	23
4.2.2.1. Componentes de Estudio	24
4.2.2.2. Estadística paramétrica	26
4.2.2.3. Estadística no paramétrica	27
4.2.3. Colección del material vegetal	27
4.2.4. Caracterización del grano de polen	32
4.2.5. Conteo de granos de polen	32
4.2.6. Siembra del grano de polen	34
4.2.7. Conservación del grano de polen	38
4.2.8. Parámetros registrados	39
V. RESULTADOS	42
5.1. Porcentaje de Germinación de Granos de Polen de 15, 30 y 45 días	42
5.2. Conteo de Granos de Polen	60
5.3. Caracterización de Granos de Polen	63
VI. DISCUCIONES	64
6.1. Germinación de Granos de Polen a los 15 días de Almacenamiento	64
6.2. Germinación de Granos de Polen a los 30 días de Almacenamiento	66
6.3. Germinación de Granos de Polen a los 45 días de Almacenamiento	68
6.4. Conteo y Caracterización de Granos de Polen	71
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. RECOMENDACIONES	73
IX. BIBLIOGRAFIA	74



## **INDICE DE CUADROS**

	Pág.
Cuadro N° 01. Medio de cultivo para la germinación in Vitro de granos de polen, según (Dávila, 2000).	18
Cuadro N° 02. Medio de cultivo para la germinación in Vitro de granos de polen, según (Taylor, 1972).	19
Cuadro N° 03. Niveles de ecotipos, momentos de cosecha de polen y condiciones de conservación.	24
Cuadro N° 04. Distribución de tratamientos.	25
Cuadro N° 05. Análisis de varianza del estudio.	26
Cuadro N° 6. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 15 días de evaluación. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$	42
Cuadro N° 7. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal ecotipos (A), evaluados a los 15 días .	42
Cuadro N° 8. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 15 días.	44
Cuadro N° 9. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 15 días.	44
Cuadro N° 10. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 15 días.	45
Cuadro N° 11. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 15 días .	45
Cuadro N° 12. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 0 días.	46



Cuadro N° 13. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 15 días.	47
Cuadro N° 14. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 30 días de evaluación. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$	48
Cuadro N° 15. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal Ecotipos (A), evaluados a los 30 días.	48
Cuadro N° 16. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 30 días.	50
Cuadro N° 17. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 0 días.	50
Cuadro N° 18. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 30 días.	51
Cuadro N° 19. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 30 días.	51
Cuadro N° 20. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 30 días.	52
Cuadro N° 21. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 30 días.	53
Cuadro N° 22. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 45 días de evaluación. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$	54
Cuadro N° 23. Prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ) para el efecto principal ecotipos (A), evaluados a los 45 días.	54

Cuadro N° 24. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 45 días.	56
Cuadro N° 25. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 45 días.	56
Cuadro N° 26. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 45 días.	57
Cuadro N° 27. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 45 días.	57
Cuadro N° 28. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 45 días.	57
Cuadro N° 29. Prueba de Duncan ( $p<0,05$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 45 días.	59
Cuadro N° 30. Conteo de estructuras reproductivas en 05 ecotipos de Sacha Inchi ( <i>Plukenetia volubilis</i> L.).	60

## **INDICE DE FIGURAS**

	Pág.
Figura N° 1. Planta de Sacha inchi en floración.	5
Figura N° 2. Inflorescencia.	5
Figura N° 3. Partes de un grano de polen bicelular.	6
Figura N° 4. Colección de muestras (granos de polen e inflorescencias) en horas de la mañana.	28
Figura N° 5. Granos de polen colectados Después de la antesis, directamente en campo y en contenedores de conservación	29
Figura N° 6. Colección de muestras sin conservación (0 días) Después de la antesis.	29
Figura N° 7. Caja térmica con hielo para conservar las muestras colectadas directamente en campo (después de la antesis).	29
Figura N° 8. Colección de muestras Antes de la antesis (ramas con inflorescencias - B florales).	30
Figura N° 9. Botones florales sin abrir sumergidas y/o colocados en solución sacarosa/ 24 horas, para completar su madurez fisiológica y abrimiento.	30
Figura N° 10. Botones florales sin abrir sumergidas en de solución sacarosa/ 24 horas a una temperatura de 20° C y H° de 100%.	30
Figura N° 11. Cámara de desecación, conteniendo la muestra de botones florales abiertos, una vez completado su madurez en una solución de sacarosa al 5%.	31
Figura N° 12. Colección de Granos de polen en laboratorio.	31
Figura N° 13. Separación de anteras y tecas.	32

Figura N° 14.	Observación de granos de polen para caracterizar su forma y tamaño.	32
Figura N° 15.	Separación de Botones, anteras y tecas, separando de ellos los granos de polen.	34
Figura N° 16.	Observación de granos de polen en una teca abierta, en estereomicroscopio (10X).	34
Figura N° 17.	Materiales y reactivos para la preparación del medio de cultivo.	35
Figura N° 18.	Preparación del medio de cultivo (Taylor).	35
Figura N° 19.	Siembra de granos de polen en láminas horadadas conteniendo medio de cultivo.	36
Figura N° 20.	Placa petri cubierto con papel aluminio conteniendo laminas con medio de cultivo en las cuales se sembró los granos de polen.	36
Figura N° 21.	Frío bar conteniendo las muestras a evaluar.	37
Figura N° 22.	Frío bar semi cerrado para mantener la temperatura e humedad ideal.	37
Figura N° 23.	Evaluación del % de germinación de granos de polen en las muestras	37
Figura N° 24.	Grano de polen germinado en medio de cultivo y observado a 6 horas después de la siembra (microscopio óptico 40X).	38
Figura N° 25.	Grano de polen germinado en medio de cultivo y observado a 12 horas después de la siembra.	38
Figura N° 26.	Muestras conservadas a T° - 8° C.	39
Figura N° 27.	Muestras conservadas a T° 8° C.	39
Figura N° 28.	Botón Floral de Sacha inchi observado en estereomicroscopio (10X)	60

- Figura N° 29. Botón floral de Sacha inchi, abierto, en el cual observamos las anteras y las tecas. 61
- Figura N° 30. Anteras y Tecas, observadas en conjunto y en estereomicroscopio (10X). 61
- Figura N° 31. Anteras con 1 Tecas abierta, donde se observa los granos de polen. Observado en estereomicroscopio (10X). 62
- Figura N° 32. Ocho granos de polen observados en microscopio óptico (40X), para su conteo utilizando una gota de agua destilada para estabilizar los granos. 62
- Figura N° 33. Ocho granos de polen observados en estereomicroscopio (10X), justo en el momento de la apertura de la teca. 62
- Figura N° 34. Grano de polen observado sin tinción en microscopio óptico (40x) señalando el largo y el ancho del mismo. 63

## RESUMEN

Con el propósito de encontrar y/o determinar una metodología para la recolección y conservación de los granos de polen de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), se tuvieron en cuenta dos etapas fonológicas de la floración. La primera etapa antes de la Antesis y la segunda etapa después de la Antesis, esto con el fin de conocer el comportamiento de ambas fases de La floración y La viabilidad de los granos de polen con respecto a La germinación y formación del fruto.

La excelente conservación de los granos de polen, demuestra que tanto el método de recolección y conservación empleados en el presente trabajo de investigación son los más óptimos y adecuados. Para ello utilizamos como uno de los parámetros muy importantes a la Temperatura ( $T^0$ ), en dos escalas como son  $8^{\circ}\text{C}$  y  $-8^{\circ}\text{C}$ , los cuales respondieron excelentemente a la acción de conservar los granos de polen, manteniendo en perfecto estado de latencia SUS características morfológicas, fisiológicas y genéticas, por ello garantizamos el uso de ambos métodos ya que quedo demostrado el alto grado de confiabilidad de los mismos.

El porcentaje de germinación lo determinamos mediante el conteo de un número aproximado de granos de polen germinados (100 granos), usando para ello un medio de cultivo propuesto por Taylor, 1972. El cual que después de varias pruebas juntamente con otras propuestas, fue La que mejores resultados ofreció. El medio cumple el papel de un estigma en completo desarrollo albergando a los granos de polen y de estos solo el que reúna las condiciones apropiadas será el que se una al gineceo y conformar el fruto propiamente dicho.

## SUMARY

With the object of find and / or to determine a methodology for the collection and preservation of pollen grains of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), were taken into account two phonological stages of flowering. The first stage before anthesis and the second stage after anthesis, this in order to know the behavior of both phases of flowering and viability of pollen grains with respect to germination and formation of fruit.

The excellent preservation of pollen grains, shows that both the collection and preservation method used in this research work are the most optimal and appropriate. We use one of the most important parameters for temperature ( $T^{\circ}$ ), two scales as  $8^{\circ}\text{C}$  and  $-8^{\circ}\text{C}$ , which responded excellently to the action to conserve the pollen grains, while in a perfect state of dormancy SUS morphological, physiological and genetic, so make use of both methods because it demonstrated the high reliability of these.

The germination percentage is determined by counting an approximate number of germinated pollen grains (100 grains), using a culture medium proposed by Taylor, 1972. Which after several tests along with other proposals, was offered the best results. The media fulfills the role of stigma in a host to complete development of pollen grains and only those meeting the conditions is that one to form the gynoecium and fruit tress.



## I. INTRODUCCIÓN

El **Sacha Inchi** (*Plukenetia volubilis* L.), representa una opción agroindustrial de gran potencial para la Amazonía y el establecimiento de sistemas agrícolas de producción sostenible y que para su aprovechamiento comercial a mediano y largo plazo, tenga previsto plantaciones con material genético seleccionado.

Actualmente se dispone de una amplia variabilidad genética en sachá inchi, establecida en el Banco Nacional de Germoplasma de Sacha Inchi del INIA “El Porvenir – Juan Guerra” y en el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana **E.E. “Pucayacu – Banda de Shilcayo”**. Por otra parte se vienen desarrollando investigaciones en el mejoramiento genético mediante la obtención de líneas puras, con la finalidad de establecer la base del mejoramiento genético en la consolidación de híbridos.

El presente trabajo de investigación busca determinar, identificar y desarrollar técnicas de recolección y conservación de granos de polen en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), y sugiere encontrar con este estudio una forma de hacer más sostenible el estudio de la biología floral y el mejoramiento genético.

Esto con el fin de poder abrir nuevas interrogantes en cuanto a buscar formas de hacer que la multiplicación y obtención de plantas, se realice en una forma más simple y sencilla.

## **II. OBJETIVOS**

- 2.1.** Complementar estudios sobre biología reproductiva masculina (polen) del Sacha inchi.
- 2.2.** Determinar la técnica o el método de recolección mas adecuado de granos de polen en 5 ecotipos de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), bajo condiciones de campo.
- 2.3.** Determinar las condiciones más adecuadas para la conservación *in vitro* de granos de polen en 5 ecotipos de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), bajo condiciones de laboratorio.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Aspectos Generales del Cultivo de Sacha inchi

##### 3.1.1. Origen y distribución

**Guerrero (2006)**, menciona que el sachá inchi es una especie propia de la amazonía peruana, dentro de ella se encuentran culturas étnicas-nativas que utilizan la almendra como un sustituto alimenticio, encontrándose en forma silvestre como un integrante de la gran biodiversidad que brinda la Selva Amazónica. Distribuida en las regiones de Loreto, San Martín, Amazonas, Junín, Ucayali, Madre de Dios y el Cuzco.

Registrándose especies como: *Plukenetia volubilis* L., *P. lorentensis* Ulei, *P. brachybotrya* M. Arg.

##### 3.1.2. Clasificación taxonómica

Según **Linneo**, citado por (**Arévalo, 1996**) menciona la clasificación taxonómica para el sachá inchi.

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Spermatophyta
CLASE	:	Dicotyledoneae
ORDEN	:	Geraniales
FAMILIA	:	Euphorbiaceae
GENERO	:	Plukenetia
ESPECIE	:	volubilis L.
NOMBRE CIENTÍFICO	:	Plukenetia volubilis L.

### **3.1.3. Descripción botánica**

**Guerrero (2006)**, menciona alguna de las características del ecotipo ventanilla trabajado en el “Fundo Miraflores” de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNSM.

**Planta.-** Caracterizada por ser voluble, perenne, semileñosa con crecimiento indeterminado.

**Raíces.-** De acuerdo al tipo, presentan raíces ramificadas no diferenciándose de una raíz principal, presentando una raíz principal en las primeras etapas de su desarrollo (raíz principal).

**Hojas.-** Alternas, acorazonadas, aseruladas, trinervadas con una nervadura central dirigida al ápice acuminado, así mismo en la base del limbo presenta 2 glándulas laterales (conteniendo en las mañanas gotitas de azúcares orgánicos) y una pequeña proyección intermedia denominada estipela (muy variable en los diversos ecotipos).

**Flores.-** Hermafroditas, monoicas, las flores masculinas son pequeñas, blanquecinas y dispuestas en racimos, en la base del racimo y lateralmente se encuentra una, dos y hasta tres flores femeninas, así mismo en las flores femeninas se

observa que el número de estigmas es igual al número de ovarios.



**Fruto.-** Son cápsulas dehiscentes, distribuidos en lóculos, el número de lóculos está en función a la variabilidad genética del sachá inchi, presentando cuatro, cinco y hasta siete lóculos.

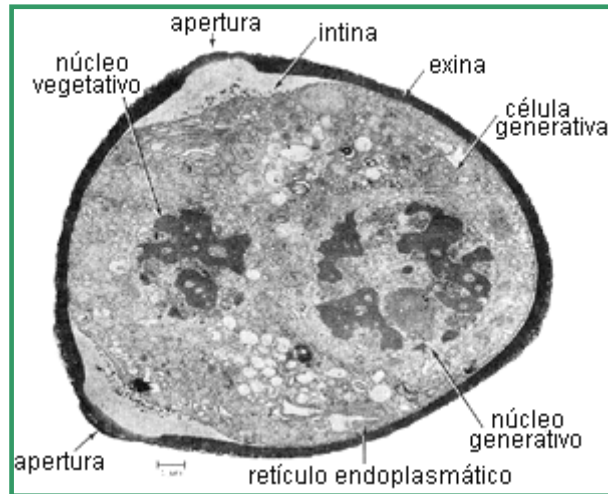
**Semilla.-** Tiene forma ovalada de color marrón-oscuro, abultada hacia el centro y aplastada hacia los costados, al abrir la testa de la semilla se tiene a la almendra de color blanco que esta protegida por una película blanquecina.

### 3.2. Métodos de Recolección y Conservación de Granos de Polen

#### 3.2.1. Polen

**García *et al.* (1996)**, menciona que el polen es un polvo producido por el estambre (órganos masculinos de la planta) es considerado un alimento muy completo en algunos aspectos, sobre todo en el aporte de

aminoácidos e hidratos de carbono. Puede contener hasta diecisiete aminoácidos distintos.



**Figura Nº 3:** Partes de un grano de polen bicelular  
**Fuente:** tomado de Esau, (1982)

**González (2006)**, menciona que en el citoplasma de la célula vegetativa del polen hay abundantes orgánulos e hidratos de carbono: RE (retículo endoplasmático), dictiosomas, plástidos con almidón que se utiliza en el crecimiento del tubo polínico, lípidos, proteínas y vitaminas. Los granos de polen de especies que deben formar tubos polínicos muy largos generalmente tienen lípidos como sustancia de reserva; los que son polinizados por insectos, tienen azúcares o aceites; los que son llevados por el viento, tienen frecuentemente almidón.

**Yong et al. (1992)**, reporta que, el cultivo y conservación de los granos de polen es importante y útil para producir plantas haploides. Ofrece también un sistema experimental eficiente para la inducción de la mutación y el manipuleo genético. **(Flores, 1997)** informa que es importante la conservación del polen en la investigación de especies e híbridos superiores; material genético que prometería mejorar la

producción y calidad de los frutos así como conferir tolerancia a plagas y enfermedades.

### **3.2.2. Etapas de desarrollo de la flor estaminada y flor pistilada**

**Cachique (2007)**, en su trabajo de investigación Estudio de la Biología Floral y Reproductiva del Cultivo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), menciona que la inflorescencia del cultivo en mención, tiene las siguientes etapas o estadios de desarrollo. Como son:

#### **➤ Desarrollo del botón floral estaminado:**

**Estadio N° 1:** Botón menor o igual a 0.1 mm. de longitud.

**Estadio N° 2:** Botón cuyo ápice se encuentra envuelto por los acúmenes de los sépalos, próximos a la apertura, de tonalidad blanquecina y donde el pedicelo ha alcanzado su máxima longitud. (Pre antesis)

**Estadio N° 4:** Ruptura a lo largo de las soldaduras de los sépalos, para dar paso a la antesis.

#### **➤ Desarrollo de la flor estaminada:**

**Estadio N° 1:** Apertura inicial de la flor, los sépalos empiezan a extenderse, anteras parcialmente visibles. (antesis)

**Estadio N° 2:** Flor madura, los sépalos extendidos parcialmente. Anteras amarillas expuestas a plenitud.



**Estadio N° 3:** Flor con sépalos extendidos al máximo, anteras con partes neurotizadas, evidencia de la visita de insectos y/o dehiscencia de las anteras.

**Estadio N° 4:** Los sépalos se empiezan a cerrar y pierden turgencia, secan y finaliza este proceso con la Aída de la misma.

➤ **Desarrollo de la flor pistilada:**

**Estadio N° 1:** Emergencia de la flor, los acúmenes de los sépalos se apertura para dar paso a la salida del pistilo.

**Estadio N° 2:** Flor que alcanzo su máxima longitud, antes de la apertura del estigma, se observa el ensanchamiento del ovario.

**Estadio N° 3:** Flor madura, estigma abierto. Se da la fecundación y la columna estilar se encuentra arqueado. Se da el crecimiento acelerado del ovario.

### **3.2.3. Colección y preparación del polen**

**Mirov (1967)** menciona que los momentos más adecuados para la recolección de polen en zonas naturales varían por especie, elevación, clima, y geografía. A medida que la zona se encuentra más cercana al ecuador, las épocas de recolección son mucho más irregulares y hasta pueden presentarse todo el año.

**Dávila (2000)**, menciona que tenemos dos momentos para la cosecha de las flores, para poder extraer los granos de polen, la primera cosecha **antes de la antesis** (ramas con botones florales), y la segunda cosecha **después de la antesis** (ramas con flores abiertas), realizándose ambas cosechas en horas de la mañana.

**Cachique (2007)**, En su trabajo de investigación estudio de la biología floral y reproductiva del cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), menciona que la etapa ideal para la recolección de polen de sachá inchi está entre la tercera (3) y cuarta (4) etapa del desarrollo floral. Por otra parte también menciona que la apertura floral ocurre desde las 5:30 a.m. a 9:00 a.m.

**Andrés V. et al., (1998)**, menciona en su trabajo de investigación viabilidad del polen del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), que para la colección de granos de polen se recogieron ramas de aproximadamente 30 cm. de longitud, en las que la mayor parte de las flores estuvieran colectadas en el 4<sup>to</sup> estadio, para luego ser colocadas en vasos precipitados con una solución de sacarosa al 5% y a 20° C, durante aproximadamente 24 horas; tiempo en que las flores alcanzaron el 5<sup>to</sup> estadio. Así mismo en ese momento se extrajeron las anteras para luego colocarlas en palcas petri de 90 mm de Ø para su desecación.

Para desecar las anteras y conseguir la soltura de los granos de polen, las placas se introdujeron en un desecar con CaCl<sub>2</sub> (Silca gel) a

temperatura ambiente, durante aproximadamente 48 horas. Posteriormente, el polen se almacenó en cámara frigorífica a 4° C.

Los porcentajes medios de germinación correspondientes a cada uno de los clones a las 48 h de incubación fueron superiores al 20%, excepto en los clones “Mauricios” y “Chicanos Archena”, que ya desde las primeras horas presentaron una germinación sensiblemente inferior. Los valores de germinación comprendidos entre 20 y 40% producen un cuajado de fruto de pobre a moderado. Los fallos en la germinación del polen in Vitro pueden deberse a deficiencias producidas durante el almacenamiento del mismo y que puede compararse por los tejidos estilar y estigmático durante la germinación.

En los trece clones estudiados no se detectó ningún caso de androesterilidad; no obstante, los porcentajes de germinación del polen resultaron significativamente diferentes. Mientras que los clones “Mauricios” y “Chicanos Archena”, después de 24 h de incubación, apenas superaron el 3% de germinación, “Real fino de Molina” y “Palabras” presentaron una germinación superior al 60% (**Andrés V. et al., 1998**).

**Pozo C. et al. (1994)**, en su trabajo de investigación aplicación de técnicas de manejo del polen antes y durante la polinización, tuvo en cuenta la siguiente metodología:

✓ **Manejo del polen antes de la polinización:**

El investigador hace referencia que los factores ambientales (lluvias, suelo, humedad, temperatura, etc.), podrían estar influyendo el momento de recolección del polen. Así mismo para el manejo de polen este debe estar refrigerado a 9 °C por intermedio de 24 horas.

✓ **Manejo del polen durante la polinización:**

Colocar el polen conservado sobre una placa petri y con la ayuda de un pincel de pelo frotar el estigma.

**Nell (2002)**, menciona que en zonas remotas de difícil acceso, la recolección de polen se puede lograr de varias maneras:

- ✓ Un método económico comienza con bolsas de Kraft; no más de 2,5 cm. de espesor.
- ✓ Sistemas adicionales para la extracción de polen también son efectivos, aunque pueden requerir de infraestructura e inversión adicional. Varios mecanismos como bolsas de aislamiento, cámaras secadoras, etc. Estos sistemas pueden ser más aptos para programas sofisticados y resultan en un producto más limpio y seco con menor inversión en la mano de obra requerida.

**Mora U. et al. (1980)**, menciona que la recolección del polen en *Bactris gasipaes* Kunth, puede realizarse mediante dos métodos:

1. **Separando la inflorescencia de la planta antes de que se abra la bráctea que la envuelve**, de ser posible el día que le corresponde abrirse, e inmediatamente después, sumergiendo en agua la base del tallo de la rama colectada. La inflorescencia o flores pueden terminar normalmente su ciclo de floración en el laboratorio, facilitando la recolección del polen. Este método permite sumergir por unos instantes toda la inflorescencia en una solución que garantice la eliminación de polen viable depositado sobre el exterior de la bráctea que podría ser contaminante.
2. Otro método consiste en **embolsar la inflorescencia directamente en la planta antes de su apertura**, los peligros de contaminación con polen extraño llevado por el viento y por *Derelomus* sp. (Curculionidae - Coleoptera), son grandes, razones por la cual deben tomarse precauciones muy estrictas.

Una vez recogido el polen por cualquiera de los dos métodos, debe cernirse para eliminar materiales indeseables como flores desprendidas y anteras sueltas, luego mezclarlo con talco y almacenarlo, para su posterior utilización.

#### **3.2.4. Conservación de los granos Polen**

**Moody et al., (1990)** menciona que la propagación del polen y el período de receptividad floral, junto con la necesidad de realizar programas de mejoramiento genético entre especies, y el deseo de reintentar

polinizaciones no exitosas son algunos de los factores que establecen la necesidad para la conservación del polen, y son estos factores que demuestran las distintas necesidades en los programas de mejoramiento genético de diversas variedades de cultivos como son:

- Conservación a corto plazo
- Conservación a mediano plazo
- Conservación a largo plazo o criopreservación

El polen puede ser conservado por unos cuantos meses, o guardado por años dependiendo de las metas del programa de mejoramiento.

#### **3.2.4.1. Conservación a Corto Plazo**

**Layne *et al.* (1963)**, menciona que la manera más efectiva para realizar la conservación del grano de polen a corto plazo es bajo refrigeración a 4° C. Esto resulta una conservación efectiva hasta aproximadamente un año, pero luego tiende a disminuir rápidamente.

#### **3.2.4.2. Conservación a Mediano Plazo**

**Duffield *et al.* (1959)**, mencionan que la conservación a mediano plazo puede ser logrado exitosamente por medio de congelación a -20° C. Se evita el congelamiento y el deshielo del polen por medio del uso de frascos pequeños. Este es el método preferible a aplicar, si se desaprovecha la época de mejor polinización, como una reserva simple de polen; si factores ambientales o

errores humanos causaron pobres resultados en la polinización el año anterior.

#### **3.2.4.3. Conservación a largo plazo**

**Hanna (1994)** menciona que para lograr la conservación a largo plazo con viabilidad aceptable, el polen puede ser congelado o secado al vacío por congelamiento a los  $-20^{\circ}\text{C}$  de la misma manera que la anterior. Esto ha sido probado como un método confiable para la conservación a largo plazo en muchas especies, y está disponible para la mayoría de los profesionales. Otra manera efectiva y muy utilizada en la agricultura es la preservación criogénica. El polen de muchas especies ha sido almacenado exitosamente por criopreservación. Criopreservación puede ser realizada por medio de ultrafreezers o refrigeradores criogénicos. Los Ultrafreezers generalmente conservan el polen a los  $-80^{\circ}\text{C}$ , mientras los refrigeradores criogénicos usan inmersión bajo nitrógeno líquido para llegar a los  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ambos métodos son efectivos, uno de los métodos requiere electricidad para mantener la temperatura baja (cortes de electricidad podrían causar daños), y el otro requiere monitoreo constante para asegurar que el polen se mantenga en sumersión.

**Dávila (2000)**, en su trabajo de investigación “Determinación del Método de Colección y conservación In vitro del grano de polen de Camu Camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh), indica que



Luego que hayamos extraído el polen coloquemos en refrigeración para su conservación bajo dos temperaturas: - 8° C y 8° C.

**Ben (1993)**, habla sobre las ventajas de la conservación de granos de polen.

**Ventajas:**

1. El polen es más económico almacenar debido a su pequeño tamaño.
2. Los bancos de polen podrían representar a poblaciones mucho más grandes y haploides.
3. El polen se manda a deshelar y a rehidratar, y esta fácilmente pronto para usarse. Los cruces controlados se pueden hacer directamente con polen mientras que, con semillas, uno tendría que esperar las plantas de semillero hasta la madurez.

### **3.3. Selección de Frascos para Conservación**

**Bramlett et al. (1981)**, menciona que los granos de polen recolectados y con el contenido de humedad deseado deben ser conservados en envases adecuados y herméticos. La selección del frasco depende del método de polinización controlada a ser utilizado. Se puede lograr la polinización utilizando bolsas de aislamiento y pinceles de pelo de camello, jeringas u otros polinizadores distintos desarrollados por programas de investigación.

### **3.4. Banco de polen**

**Trujillo (2006)**, menciona que constituye otro método para almacenar información genética y es un paso necesario para realizar experimentos de hibridación de plantas. Las condiciones necesarias para mantener la viabilidad del polen son semejantes a las del almacenamiento de semillas, a pesar de que el período de viabilidad del polen es más breve. El polen se debe almacenar a bajas temperaturas (-18° C) luego de un proceso de desecación (3 - 8 % de humedad relativa).

### **3.5. Caracterización del Grano de Polen**

**Dávila (2000)**, menciona que para realizar las pruebas de recolección, conservación y entre otros. Primero son descritas las características del grano de polen, en parámetros como: forma, tamaño y apertura de anteras.

**Carballo (2001)**, menciona que las características de los granos de polen pueden estudiarse utilizando los siguientes métodos para describir tanto la forma como el Tamaño y se realiza de la siguiente manera:

#### **3.5.1. Forma:**

- ♣ Elegimos al azar una población de cinco plantas, los cuales servirán como muestras o material de trabajo.
- ♣ Luego coleccionar las muestras de las cinco plantas, eligiendo para ello al azar cinco flores en momento de la antesis, separando tres anteras por cada flor.

- ♣ Posteriormente proceder a separar los granos de polen de las anteras y las tecas y colocarlas a cada una de ellas en láminas porta objetos con una gota de colorante (tinción) y examinarlas en un microscopio.
- ♣ Como agentes de tinción se deben utilizar, el colorante **Carmín acético o Rojo calberla**, y tomar la tinsión que mas se adapte a nuestro trabajo para describir sus características físicas del grano de polen.

### 3.5.2. Tamaño:

- ♣ Elegimos al azar entre el total de plantas, cinco flores inmediatamente después de la antesis, de las cuales se separaron tres anteras por cada flor.
- ♣ Luego, con la ayuda de agujas de disección separar los granos de polen de las tecas para ser colocadas en láminas porta objetos.
- ♣ Debido que los medios de montaje pueden influir en el tamaño de los granos de polen, se utilizarán tres diferentes medios de montaje: Glicerina, acetocarmín y violeta de genciana, utilizando la que más nos convenga
- ♣ Una vez montado los granos de polen se procedió a medir con la ayuda de un microscopio compuesto y un micrómetro ocular calibrado, las dimensiones de los granos de polen.

- ♣ El promedio ideal a medir es de 32 granos de polen, y expresando los resultados en promedio.

### 3.6. Evaluación de Viabilidad del Grano de Polen

**Dávila (2000)**, menciona que la evaluación de la viabilidad del grano de polen se realiza mediante una prueba de germinación que consiste en la utilización de un medio de cultivo.

**Cuadro N° 1.** Medio cultivo para la germinación in vitro de granos de polen

(100 ml)

INSUMOS	CONCENTRACION
Sacarosa	10.00 gr.
Ácido bórico	0.01gr.
Nitrato de calcio	0.03 gr.
Agua destilada	100. 0 ml.

**Fuente:** Tomado de (Dávila, 2000)

**Taylor (1972)**, menciona que para mejorar la germinación de los granos de polen de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y evaluar eficientemente la viabilidad y el crecimiento del tubo polínico, se utilizará el siguiente medio de cultivo.

**Cuadro N° 2.** Medio cultivo para la germinación in vitro de granos de polen (100 ml)

Insumos	Concentración
Agar	2.0 gr.
Glucosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	30.0 gr.
Nitrato de potasio ( $KNO_3$ )	5,3 mg.
Sulfato de manganeso hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )	51,7 mg.
Acido Bórico hidratado ( $H_3BO_3 \cdot H_2O$ )	10,3 mg.
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	10,3 mg.
Agua destilada	100.0 ml

**Fuente:** Tomado de Taylor (1972)

### 3.7. Conteo de Granos de Polen

**Gelos et al. (2005)**, menciona que el conteo y determinación de granos de polen se realiza con un microscopio óptico, con un objetivo de 40X y un ocular de 10X, por lo tanto la muestra se observa con un aumento total de 400 veces su tamaño. Cada muestra es montada (colocada) en un portaobjetos acanalado y cubierto por cubreobjetos de 22 x 22 mm. De este modo se obtiene un valor que expresa la cantidad de granos de polen correspondientes a 3,12 m<sup>3</sup> de aire muestreado.

Para que los granos de polen sean más identificables en la muestra deben ser teñidos con un colorante especial denominado “rojo calberla”, el cual solo tiñe a los granos de polen dejando el resto del material (esporas de hongos, partículas de polvo, etc.) sin colorear.

**Andrés V. et al., (1998)** menciona que se disolvieron 45 ml de ácido acético puro en 55 ml de agua destilada y se vertieron en un erlenmeyer, en el que previamente se habían adicionado limaduras de hierro y se mantuvieron en ebullición durante 4 minutos. Seguidamente, se añadió 1g de Carmín (Sigma C- 1022) por cada 100 ml de disolución, continuo la ebullición durante 1 min. y se filtró.

Para la tinción, se impregno un pincel con polen, y se sacudió sobre un portaobjetos, procurando que la distribución fuera uniforme. A continuación se deposito una gota de colorante y pasados 5 – 10 segundos se procedió a la observación al microscopio (40X). Para el recuento se realizaron dos preparaciones con cada una de las muestras a evaluar. En cada preparación se observaron de dos a tres muestras y se procedió al recuento de los granos en cada uno de ellos.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Materiales**

#### **4.1.1. Materiales de vidrio de laboratorio:**

- Placas petri
- Laminas porta objeto horadadas
- Laminas cubre objetos
- Vaso precipitado
- Frascos de 15 onzas
- Pipetas de 1ml, 25ml y 10ml
- Matraz Erlenmeyer
- Otros.

#### **4.1.2. Materiales de Metal y Plástico de laboratorio:**

- Mango porta bisturí
- Hojas de bisturí
- Pinzas punta agujas de reloj
- Papel aluminio
- Hexagonales porta muestras
- Prepipetas
- Embudos
- Frascos de conservación
- Tijera podadora
- Caja de tecnopor
- Otros: Algodón, papel toalla, etc.



#### **4.1.3. Equipos de laboratorio:**

- Estéreo microscopio
- Microscopio
- Refrigeradora
- Micro pipeta
- Friobar
- Horno microondas
- Peachimetro (pH)
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Balanza analítica
- Cocina de dispersión eléctrica
- Otros.

#### **4.1.4. Reactivos de laboratorio:**

- Glucosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )
- Acido Bórico hidratado ( $H_3BO_3 \cdot H_2O$ )
- Nitrato de potasio ( $KNO_3$ )
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- Sulfato de manganeso hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )
- Agar
- Carmín Acético o Acido Acético
- Limaduras de Hierro
- Agua destilada, Agua destilada estéril
- Otros.

## **4.2. Metodología**

### **4.2.1. Ubicación del Experimento.**

Los estudios del presente trabajo de investigación se desarrollaron en el Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSM-T en convenio con el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), ubicado en el Distrito de Morales, Provincia de San Martín y Departamento de San Martín.

#### **Ubicación Geográfica**

Longitud Oeste : 76° 21'  
Latitud Sur : 6° 29'  
Altitud : 350 m.s.n.m.m.

#### **Ubicación Política**

Departamento : San Martín  
Provincia : San Martín  
Distrito : Morales

### **4.2.2. Diseño experimental**

Se aplicó un DCA con arreglo factorial 5 x 2 x 2, comprendido por el factor **(A)**: Ecotipos, Factor **(B)**: Momentos de cosecha de polen y el factor **(C)**: condiciones de conservación; teniéndose un total de 20 tratamientos en estudio. Cada tratamiento estuvo constituido por 5 repeticiones y cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco

de conservación de (50mm x 100,1mm x 30mm) que almacenaba polen de 10 botones florales.

#### 4.2.2.1. Componentes de estudio

- **Factor a:** 5 ecotipos
  - a<sub>1</sub>:** ecotipo 4 (Mishquiyacu)
  - a<sub>2</sub>:** ecotipo 9 (Tununtunumba)
  - a<sub>3</sub>:** ecotipo 14 (Pinto recodo)
  - a<sub>4</sub>:** ecotipo 16 (Muyuy)
  - a<sub>5</sub>:** ecotipo 22 (Tamboyaguas)
  
- **Factor B:** 2 momentos de cosecha
  - b<sub>1</sub>:** Antes de la antesis
  - b<sub>2</sub>:** Después de la antesis
  
- **Factor C:** 2 condiciones de conservación
  - c<sub>1</sub>:** 8° C
  - c<sub>2</sub>:** - 8° C

**Cuadro N° 3:** Niveles de ecotipos, momentos de cosecha de polen y condiciones de conservación.

FACTORES	NIVELES				
Ecotipos (a)	Ecotipos				
	Ecot. 04 (a <sub>1</sub> )	Ecot. 09 (a <sub>2</sub> )	Ecot. 14 (a <sub>3</sub> )	Ecot. 16 (a <sub>4</sub> )	Ecot. 22 (a <sub>5</sub> )
Momentos de cosecha de flores (b)	Momentos de cosecha de flores				
	Antes de la antesis (b <sub>1</sub> )		Después de la antesis (b <sub>2</sub> )		
Condiciones de conservación (c)	Condiciones de conservación				
	8 °C (c <sub>1</sub> )			-8 °C (c <sub>2</sub> )	

#### 4.2.2.2. Tratamientos en estudio

**Cuadro N° 4: Distribución de tratamientos**

Trat.	COMB.	Ecotipos	M. cosecha	C. Conservación
T-1	$a_1b_1c_1$	Ecot. 04	A. antesis	8 °C
T-2	$a_1b_1c_2$	Ecot. 04	A. antesis	- 8 °C
T-3	$a_1b_2c_1$	Ecot. 04	D. antesis	8 °C
T-4	$a_1b_2c_2$	Ecot. 04	D. antesis	- 8 °C
T-5	$a_2b_1c_1$	Ecot. 09	A. antesis	8 °C
T-6	$a_2b_1c_2$	Ecot. 09	A. antesis	- 8 °C
T-7	$a_2b_2c_1$	Ecot. 09	D. antesis	8 °C
T-8	$a_2b_2c_2$	Ecot. 09	D. antesis	- 8 °C
T-9	$a_3b_1c_1$	Ecot. 14	A. antesis	8 °C
T-10	$a_3b_1c_2$	Ecot. 14	A. antesis	- 8 °C
T-11	$a_3b_2c_1$	Ecot. 14	D. antesis	8 °C
T-12	$a_3b_2c_2$	Ecot. 14	D. antesis	- 8 °C
T-13	$a_4b_1c_1$	Ecot. 16	A. antesis	8 °C
T-14	$a_4b_1c_2$	Ecot. 16	A. antesis	- 8 °C
T-15	$a_4b_2c_1$	Ecot. 16	D. antesis	8 °C
T-16	$a_4b_2c_2$	Ecot. 16	D. antesis	- 8 °C
T-17	$a_5b_1c_1$	Ecot. 22	A. antesis	8 °C
T-18	$a_5b_1c_2$	Ecot. 22	A. antesis	- 8 °C
T-19	$a_5b_2c_1$	Ecot. 22	D. antesis	8 °C
T-20	$a_5b_2c_2$	Ecot. 22	D. antesis	- 8 °C

#### Modelo Aditivo Lineal:

**Modelo Matemático:**  $Y_k(ijk) = \mu + \lambda_i + \beta_j + \alpha_k + \lambda\beta_{ij} + \lambda\alpha_{ik} + \beta\alpha_{jk} + \lambda\beta\alpha_{ijk} + \xi(ijk)$

**Donde:**

$Y_k(ijk)$  = Resultado de una unidad experimental

$\mu$  = Media general

$\lambda_i$  = Efecto principal del factor A

$\beta_j$  = Efecto principal del factor B

$\alpha_k$  = Efecto principal del factor C

- $\lambda\beta_{ij}$  = Efecto de la interacción AB  
 $\lambda\delta_{ik}$  = Efecto de la interacción AC  
 $\beta\delta_{jk}$  = Efecto de la interacción BC  
 $\lambda\beta\delta_{ijk}$  = Efecto de la interacción ABC  
 $\xi(ijk)$  = Error de la unidad experimental

**Cuadro N° 5: Análisis de varianza del estudio**

F.V.	GL
Tratamientos	$T - 1 = 19$
Factor (A)	$p - 1 = 3$
Factor B	$q - 1 = 2$
Factor C	$r - 1 = 1$
Factor A*Factor B	$(p - 1) (q - 1) = 4$
Factor A*Factor C	$(p - 1) (r - 1) = 4$
Factor B*Factor C	$(p - 1) (r - 1) = 1$
Factor A*Factor B*Factor C	$(p - 1) (q - 1) (r - 1) = 4$
Error	$(s - 1) (p q r) = 20$
<b>Total</b>	<b><math>p q r - 1 = 39</math></b>

Para complementar los resultados del presente estudio, se utilizó estadística paramétrica y no paramétrica.

#### 4.2.2.2. Estadística Paramétrica:

Se aplicó estadística paramétrica a los tratamientos, donde se estudio los **ecotipos, momentos de cosecha de polen y condiciones de conservación** para la evaluación del comportamiento, factores principales y sus interacciones entre factores puestos en estudio, evaluándose (media general, coeficiente de determinación, coeficiente de variabilidad, etc.).

Utilizándose el software estadístico infostat 1.1., para el análisis y procesamiento de datos estadísticos.

#### **4.2.2.3. Estadística No Paramétrica:**

Se aplicó para las evaluaciones de conteo de granos de polen, caracterización de granos de polen, germinación del grano de polen.

#### **4.2.3. Colección del material vegetal**

La colección de granos de polen se realizó en cinco accesiones de sachá inchi instaladas en el campo experimental “Pucayacu” ubicado en el Distrito La Banda de Shilcayo – Caserío de Bello Horizonte. Las accesiones que se colectaron fueron 5, las mismas que llevan el nombre de su lugar de origen de colección, las cuales son:

**Accesión N° 04: MISHQUIYACU**

**Accesión N° 09: TUNUNTUNUMBA**

**Accesión N° 14: PINTO RECODO**

**Accesión N° 16: MUYUY**

**Accesión N° 22: TAMBOYAGUAS**

- ❖ La colección se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por **Dávila (2000)**, en dos etapas de la floración; la primera etapa antes de la antesis (ramas con botones florales cerrados) y la segunda etapa después de la antesis (ramas con botones abiertos).

- ❖ La colección del material vegetal se realizó en varias oportunidades, entre las 7:00 – 7:30 a.m., teniendo en cuenta las condiciones medio ambientales de la zona como son la Temperatura con un 26° C y la Humedad relativa con un 80%.



- ❖ La extracción del grano de polen para las flores colectadas después de la antesis se realizó directamente en campo, consistió en sujetar flores abiertas y realizar ligeros golpes sobre la pinza, con la finalidad de que los granos de polen ingresen por caída libre a los frascos de conservación.
- ❖ Para las muestras sin conservación y los tratamientos después de la antesis ( $a_2b_1 - a_2b_2$ ), la colección se realizó en campo ya sea en frascos de conservación y/o en láminas porta objetos.



**Figura N° 5:** Granos de polen colectados Después de la antesis, directamente en campo y en frascos de conservación.



**Figura N° 6:** Colección de muestras sin conservación (0 días) Después de la antesis

S

Para las colecciones de polen realizadas en campo, se acondicionaron los frascos de conservación con granos de polen en una caja térmica (tecnopor), preparada previamente con hielo para mantener la conservación de las muestras, hasta que las mismas puedan ingresar a la cámara de refrigeración.



**Figura N° 7:** Caja térmica con hielo para conservar las muestras colectadas directamente en campo (después de la antesis).



- ❖ Mientras que para los tratamientos antes de la antesis ( $a_1b_1 - a_1b_2$ ), se realizó la colección de ramas con botones florales que estaban en el cuarto estadio de desarrollo, los cuales fueron llevados al Laboratorio para su aislamiento en botones unitarios en una solución de sacarosa al 5%.



**Figura N° 8:** Colección de muestras Antes de la antesis (ramas con inflorescencias - B florales)



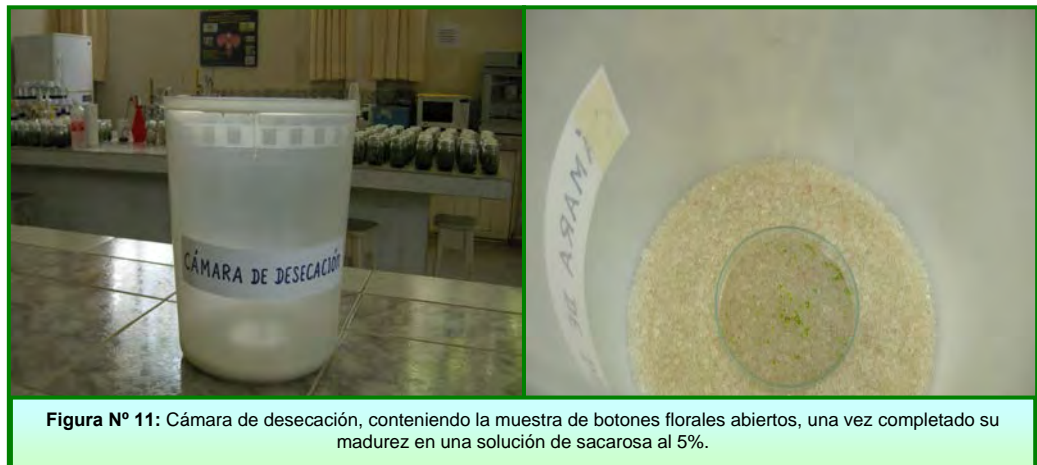
**Figura N° 9:** Botones florales sin abrir sumergidas y/o colocados en solución sacarosa/ 24 horas, para completar su madurez fisiológica y abrimiento.

- ❖ Los mismos que tienen que permanecer en un ambiente apropiado, con una temperatura de 20° C y una humedad relativa del 100%, hasta haber alcanzado el cuarto estadio (madurez completa).



**Figura N° 10:** Botones florales sin abrir sumergidas en de solución sacarosa/ 24 horas a una temperatura de 20° C y H° de 100%.

- ❖ Al cabo de 24 horas, los botones colocados en la solución de sacarosa mostraron una apertura, los mismos que fueron aislados a una placa petri y acondicionados en una cámara con silica gel por un tiempo de 15', tiempo suficiente para la dehiscencia de tecas.



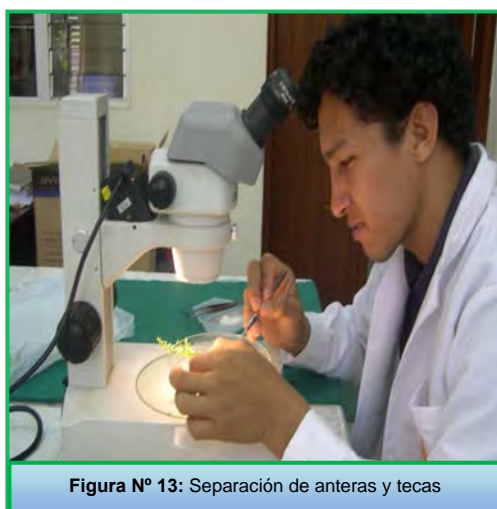
- ❖ Completado la desecación, se procedió a la colección del polen sujetando a cada botón y realizando golpes suaves a fin de que los granos de polen ingresen por caída libre a los frascos de conservación.



- ❖ La inoculación del polen propiamente dicho se hizo en un medio de cultivo de germinación (**Cuadro 2**), que estaba acondicionado en láminas porta objetos horadados o bicóncavos, **ver figura N° 6**.

#### 4.2.4. Caracterización del grano de polen

- La caracterización de los granos de polen se realizó en un estéreomicroscopio y microscopio compuesto a una amplitud de 10X - 40X, donde se analizo características como: forma y tamaño.
- Para la caracterización morfológica de los granos de polen se utilizo el método descrito por **(Carballo, 2001)**.
- Tomamos de cada ecotipo, 5 flores, de las cuales separamos 2 anteras de cada flor, luego colocamos los granos de polen de cada antera en láminas porta objetos, procediendo luego a la observación de la forma y midiendo el tamaño de los mismos.
- En algunos casos utilizamos tinción, pero en la mayoría de las observaciones no se utilizo, porque muchas veces distorsionaba la forma física de los granos de polen.



#### 4.2.5. Conteo de granos de polen

- ✓ El conteo lo realizamos mediante el método de **(Andrés *et al.*, 1998)** utilizando el colorante carmín acético o carmín (Sigma C- 1022) para ello utilizamos tanto un microscopio óptico como un estéreomicroscopio.
  
- ✓ Una vez obtenidas las muestras de las 5 accesiones o ecotipos, procedimos a separar los botones florales de las inflorescencias para facilitar nuestro trabajo y manipuleo de los mismos; separamos 10 inflorescencias masculinas por accesión y 2 botones florales por inflorescencia, de los cuales se contaron 5 anteras por botón floral dándonos de este modo un número promedio de granos de polen por antera y por botón floral.
  
- ✓ En la mayoría de los casos el conteo fue sin tinción o sin colorante ya que muchas veces la coloración dificultaba el conteo, porque en la mayoría de los casos el colorante también teñía a las impurezas que se encontraban en la muestra.
  
- ✓ También se realizó el conteo de número de anteras por botón floral, así como el número de tecas por antera, con los cuales no se tuvo mayor dificultad, ya que para ello solo utilizamos el estéreo microscopio con un aumento de (10X).

- ✓ También en algunos casos para el conteo de los granos de polen, utilizamos la ayuda de un microscopio óptico con un aumento de (40X; 100X; 400X) utilizando en algunos casos los tres objetivos, todo el conteo fue realizado en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, por estar equipado apropiadamente para dicho trabajo.



#### 4.2.6. Siembra del grano de polen

- La siembra del grano de polen del cultivo en mención, se realizó en un medio de cultivo formulado por **(Taylor, 1972)** Cuadro 2, utilizando la metodología del mismo, así como los insumos (reactivos) y equipos necesarios, para conocer el porcentaje máximo de germinación de los granos de polen.
- Para ello se utilizó una metodología simple y sencilla siendo esta perteneciente al autor antes mencionado y se realiza de la siguiente manera:



### ○ Método de Siembra

Pasos:

1. Preparamos el medio de cultivo (Cuadro N° 2), **ver las figuras 17 y 18.**



**Figura 17:** Materiales y reactivos para la preparación del medio de cultivo



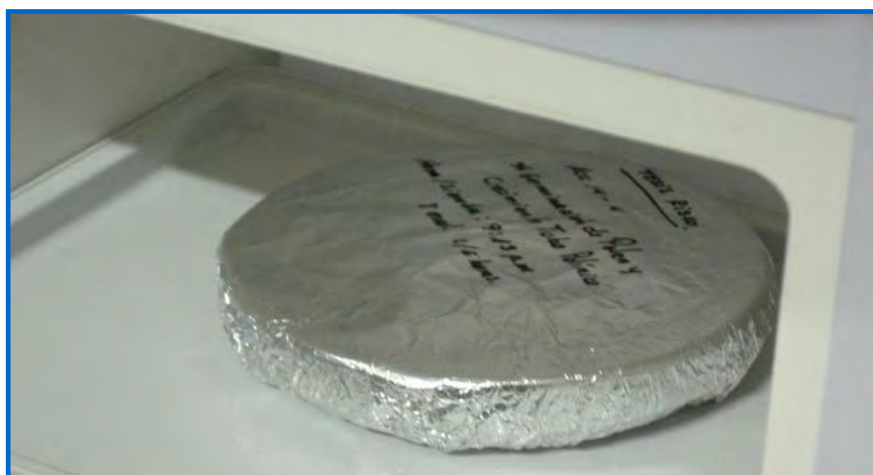
**Figura 18:** Preparación del medio de cultivo (Taylor)

2. Una vez preparado el medio de cultivo, se procedió a colocar 25  $\mu$ l de medio de cultivo en cada pocillo de la lámina porta objeto, como se puede observar en la **figura 6.**
3. Una vez colocado el medio cultivo en la lámina porta objeto, proseguimos a sembrar los granos de polen, esto con la ayuda de un pincel de cerda fina, con ella recogimos de los contenedores una cantidad apropiada de granos de polen y la esparcimos en el medio de cultivo uniformemente. Esto se puede observar en las **figuras 6 y 19.**



**Figura 19:** Siembra de granos de polen en láminas horadadas conteniendo medio de cultivo.

4. Realizada la siembra proseguimos a marcar las muestras sembradas, las mismas que son llevadas y tapadas dentro de unas placas petri, y la cual es cubierta en forma simple con papel aluminio para evitar el ingreso de la luz en forma directa, ver en **figura 20**.



**Figura 20:** Placa petri cubierta con papel aluminio conteniendo laminas con medio de cultivo en las cuales se sembró los granos de polen.

5. Luego la llevamos a una cámara fría (Friobar) donde la temperatura es de 20° C y la humedad relativa es del 100%, la cual tiene que ser constante durante las 48 horas de evaluación.



**Figura 21:** Frío bar, conteniendo las muestras a evaluar



**Figura 22:** Frío bar semi cerrado para mantener la temperatura e humedad ideal.

6. Transcurrido las 6 primeras horas, realizamos la evaluación, observando a 12 horas, 24 horas y 48 horas, tiempos en los cuales medimos el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen, ver **figura 23**.



**Figura 23:** Evaluación del % de germinación de granos de polen en las muestras.





#### 4.2.7. Conservación del grano de Polen

- Para la conservación del grano de polen se empleo el método de **(Layne et al., 1963)** conservación a corto plazo, el cual puede conservar desde un mes hasta un año con parámetros de temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ , ya que estas son las que más se adecuaron.
- La conservación lo realizamos utilizando cámaras frigoríficas o refrigeradoras (2) a las cuales se hizo una previa evaluación sobre la temperatura utilizando para ello un sensor de temperatura (**termo-higrómetro**), obteniendo los siguientes resultados:

1. Refrigeradora N° 1 :  **$-8^{\circ}\text{C}$**  (Espacio de congelación)
2. Refrigeradora N° 2 :  **$8^{\circ}\text{C}$**  (Espacio de conservación)

Siendo dichas temperaturas ideales para el desarrollo del trabajo de investigación.

- Contando con las temperaturas ideales, se empezó a conservar con un tiempo de duración de 45 días, con intervalos de evaluación de cada 15 días. La conservación de las muestras lo realizamos en frascos de conservación de **50 x 100,1 x 30 mm** (frascos de rollos de cámara fotográfica) de color blanco, por ser estas muy apropiadas y de fácil manejo, las cuales se agrupaban cada 5 frascos y colocados en una palca petri para una mejor ubicación dentro de la cámara de conservación. La conservación se realizo a corto plazo, tendiendo en cuenta el tiempo de duración del trabajo de investigación, lo cual nos ayudo a determinar hasta cuanto tiempo es factible poder conservar los granos de polen de este cultivo (de 1 año a más).



**Figura 26:** Muestras conservadas a T° - 8° C.



**Figura 27:** Muestras conservadas a T° 8° C

#### **4.2.8. Parámetros registrados**

##### **1. Porcentaje de germinación de granos de polen.**

El porcentaje de germinación se hizo para conocer la viabilidad y período de latencia de los granos de polen, con respecto al tiempo de conservación al cual estaban sometidos. Utilizando para ello un medio de cultivo que simule características similares al estigma de

una flor femenina donde el grano de polen pueda germinar sin ningún problema.

Dicha germinación se realizó en láminas porta objetos horadadas conteniendo medio de cultivo, para luego ser llevado a un frigorífico con características de temperatura y humedad apropiadas al caso.

## **2. Conteo de granos de polen.**

Se hizo con el único fin de conocer el número exacto de granos de polen con que cuenta un botón floral así como también una inflorescencia masculina de *sacha inchi* ya que hasta ahora para muchos estos datos son desconocidos. El conteo se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (10X) y un microscopio óptico (40X), esto para facilitar la visibilidad de los granos de polen que son muy pequeños y a simple vista no se distinguen.

Pero también se utilizó en algunos casos colorantes de tensión, pero en la mayoría de veces no se utilizó porque estos teñían muchas veces también las impurezas.

## **3. Caracterización morfológica del grano de polen.**

La caracterización lo realizamos con el fin de conocer la forma y tamaño de los granos de polen, características que servirán para estudios posteriores de botánica, para ello utilizamos un microscopio

óptico de (40X) y un ocular micrométrico el cual facilitaba conocer las medidas exactas en micras de los granos de polen.

#### **4. Longitud de trayectoria del tubo polínico.**

Lo realizamos básicamente con el fin de conocer las dimensiones con las cuales cuenta el tubo polínico del sachá inchi (Largo, Ancho y grosor), ya que en varias bibliografías se menciona que este debe tener el doble o la misma dimensión que el grano de polen mismo.

Para lo cual utilizamos un microscopio óptico (40X) así como un ocular micrométrico y conocer de esta manera las dimensiones de tubo polínico en micras.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Porcentaje de Germinación de Granos de Polen (15, 30 Y 45 días)

**Cuadro N° 6:** Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 15 días de evaluación. Datos transformados  $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$ .

F.V.	G.L	SC	CM	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Tratamientos	19	0,7973	0,042	3,4268	(2,266-3,15)	**
Factor A	4	0,3322	0,083	6,7821	(2,86-4,43)	**
Factor B	1	0,0116	0,0116	0,9441	(4,35-8,096)	N.S
Factor C	1	0,0032	0,0032	0,2646	(4,35-8,096)	N.S
Factor A*Factor B	4	0,2878	0,072	5,8762	(2,86-4,430)	**
Factor A*Factor C	4	0,0822	0,0205	1,6779	(2,86-4,430)	N.S
Factor B*Factor C	1	0,0518	0,0518	4,2336	(4,35-8,096)	N.S
Factor A*Factor B*Factor C	4	0,0284	0,0071	0,5805	(2,86-4,430)	N.S
Error	20	0,2449	0,0122			
Total	39	1,0422				

N.S= No significativo

\*=Significativo

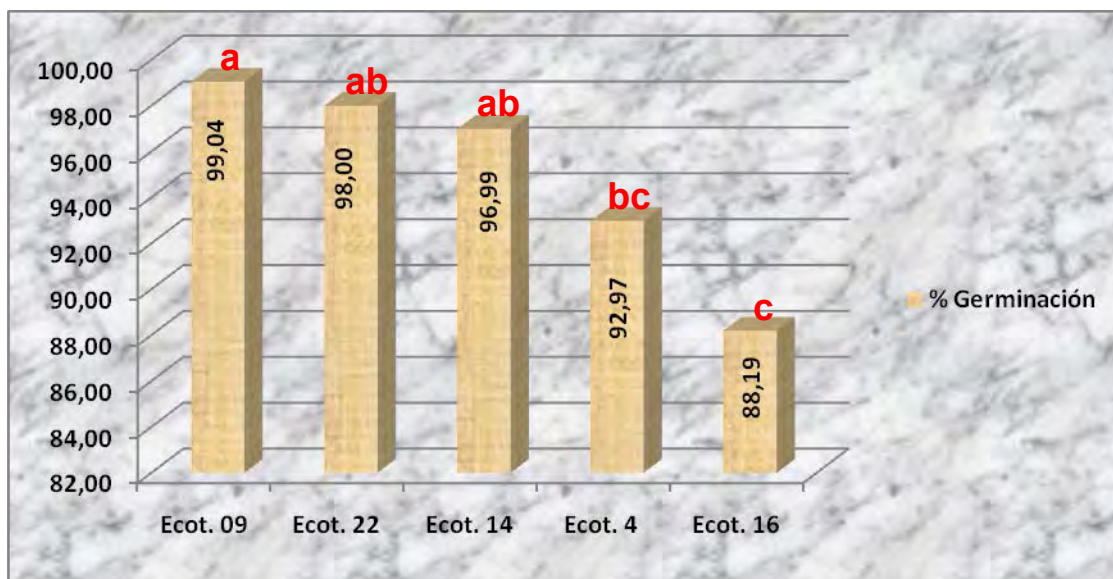
\*\*= Altamente significativo.

**Promedio = 93,98%**

**R<sup>2</sup>=76,50%**

**C.V=8,11%**

**Cuadro N° 7:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto principal ecotipos (A), evaluados a los 15 días.



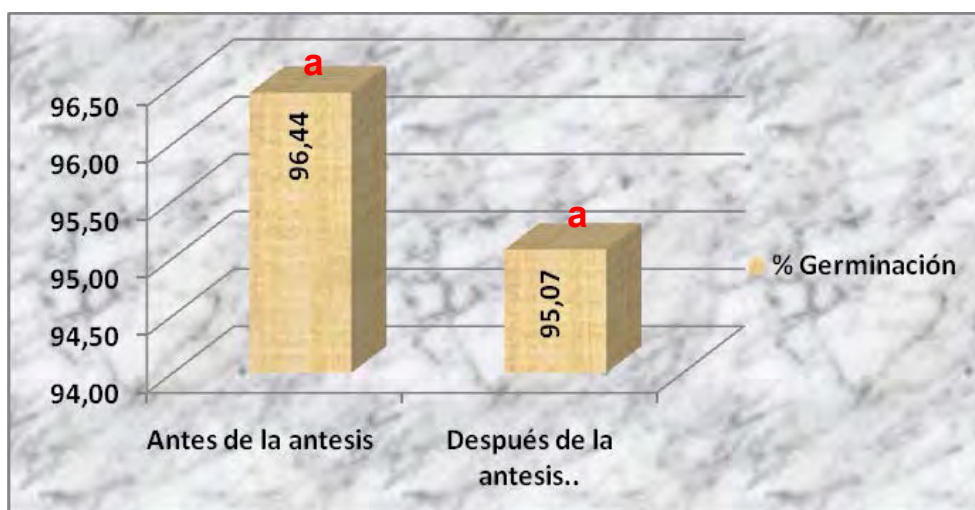
Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

De acuerdo al análisis de varianza para evaluar el porcentaje de germinación a los 15 días de almacenamiento el **Cuadro 6**, muestra para los tratamientos puestos en estudio una alta significancia, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de **76,50%** y un coeficiente de variabilidad (C.V) de **8,11%**, índices estadísticos aceptables según (**Calzada, 1982**).

Cabe mencionar también que para los efectos principales, únicamente para los ecotipos se muestra una alta significancia, no habiéndose registrado significancia alguna para los momentos de cosecha, condiciones de conservación, así mismo las interacciones dobles tales como (A) x (C), (B) x (C) y la interacción triple (A) x (B) x (C), y haciéndose factible una alta significancia para la interacción doble (A) x (B). Donde podemos mencionar que la alta significancia mostrada en los ecotipos se debe a la variabilidad existente entre ellos.

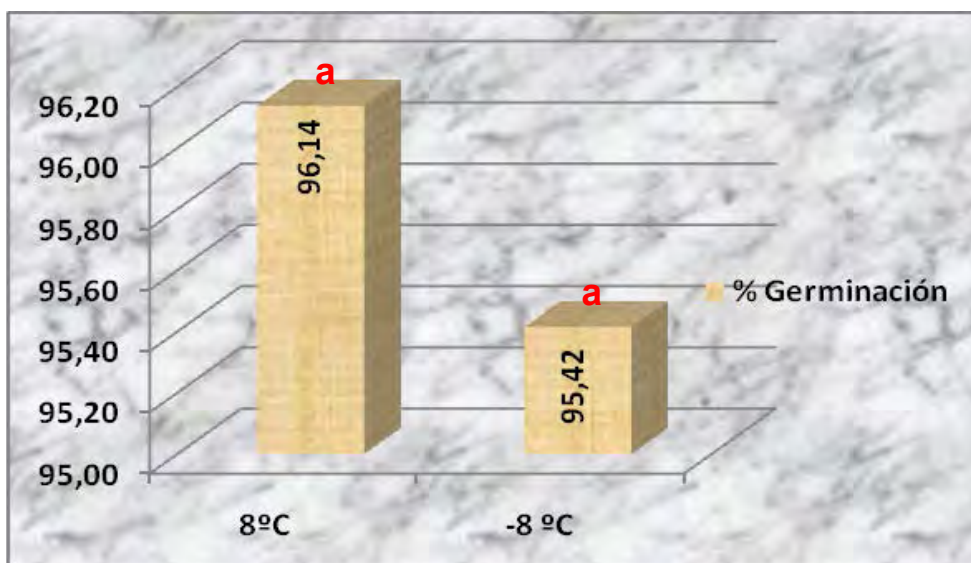
De acuerdo al **Cuadro 7**, la prueba de Duncan para el efecto principal (A) Ecotipos, acerca del comportamiento de los ecotipos en el proceso de germinación de polen, se reporta que el ecotipo 9 y el ecotipo 22, mantienen el más alto porcentaje de germinación con 99,04% y 98,00% respectivamente, difiriendo de los demás tratamientos en estudio, como el ecotipo 16 que obtuvo la más baja tasa de germinación, estos resultados se deben esencialmente a la variabilidad genética presente en los ecotipos.

**Cuadro N° 8:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 15 días.



Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 9:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 15 días.



Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

De acuerdo al **Cuadro 8**, la prueba de Duncan, para el efecto principal (B) Momentos de Cosecha, se reporta que la cosecha de polen Antes de la Antesis ha obtenido la mayor tasa de germinación en un 96,44%, difiriendo del segundo método de cosecha (Después de Antesis) con 95,07%. Por otro lado para el efecto principal (C) Condiciones de Conservación (**Cuadro**



9), se reporta que los granos conservados a los 8° C y -8° C estadísticamente son iguales, diferenciándose entre sí.

**Cuadro N° 10:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 15 días.

Factor A	Factor B	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 09	Antes de la antesis	100,00	a
Ecot. 22	Antes de la antesis	100,00	a
Ecot. 14	Después de la antesis	98,30	a b
Ecot. 09	Después de la antesis	96,22	a b c
Ecot. 4	Después de la antesis	95,52	a b c
Ecot. 14	Antes de la antesis	95,31	a b c
Ecot. 22	Después de la antesis	92,19	b c
Ecot. 16	Después de la antesis	91,50	b c
Ecot. 4	Antes de la antesis	89,91	b c
Ecot. 16	Antes de la antesis	84,42	c

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 11:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 15 días.

Factor A	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 09	-8 °C	99,53	a
Ecot. 22	-8 °C	98,99	a b
Ecot. 14	8°C	98,72	a b c
Ecot. 09	8°C	98,36	a b c
Ecot. 22	8°C	96,68	a b c
Ecot. 4	8°C	95,92	a b c
Ecot. 14	-8 °C	94,54	a b c
Ecot. 4	-8 °C	89,30	b c
Ecot. 16	-8 °C	88,83	b c
Ecot. 16	8°C	87,54	c

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Por otro lado las combinaciones de los factores (A) x (B): Ecotipos x Momentos de Cosecha, se reporta en el **Cuadro 10**, un mejor comportamiento en la germinación de polen para los Ecotipos N° 9 y 22, con polen cosechado Antes de la Antesis en un 100%, difiriendo estadística y numéricamente de los demás tratamientos puestos en estudio. Asi mismo



para la combinación (A) x (C): Ecotipos x Condiciones de Conservación (**Cuadro 11**), independientemente de los Ecotipos y las Condiciones de Conservación tanto para 8° C y -8° C, no son tan significantes en la germinación de polen para los Ecotipos N° 9 y 16, diferenciándose estadística y numéricamente de los demás tratamientos.

**Cuadro N° 12:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 15 días.

Factor B	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Antes de la antesis	8°C	97,92	<b>a</b>
Después de la antesis	-8 °C	96,18	<b>a</b>
Antes de la antesis	-8 °C	94,59	<b>a</b>
Después de la antesis	8°C	93,84	<b>a</b>

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Sin embargo, independientemente de las Condiciones de Conservación estudiadas en 8° C y -8° C, la cosecha de polen Antes y Después de la antesis resultan ser ambas muy favorables respecto a las dos Temperaturas de conservación (**Cuadro 12**).

**Cuadro 13:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 15 días.

Factor A	Factor B	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 22	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	a
Ecot. 22	Antes de la antesis	8°C	100,00	a
Ecot. 09	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	a
Ecot. 09	Antes de la antesis	8°C	100,00	a
Ecot. 14	Antes de la antesis	8°C	99,27	a b
Ecot. 14	Después de la antesis	-8 °C	98,55	a b
Ecot. 09	Después de la antesis	-8 °C	98,17	a b
Ecot. 14	Después de la antesis	8°C	98,03	a b
Ecot. 4	Después de la antesis	8°C	96,22	a b
Ecot. 22	Después de la antesis	-8 °C	96,02	a b
Ecot. 4	Antes de la antesis	8°C	95,62	a b
Ecot. 4	Después de la antesis	-8 °C	94,77	a b
Ecot. 09	Después de la antesis	8°C	93,60	a b
Ecot. 16	Después de la antesis	-8 °C	91,50	a b
Ecot. 16	Después de la antesis	8°C	91,50	a b
Ecot. 14	Antes de la antesis	-8 °C	88,19	a b
Ecot. 22	Después de la antesis	8°C	87,21	a b
Ecot. 16	Antes de la antesis	-8 °C	85,84	b
Ecot. 16	Antes de la antesis	8°C	82,94	b
Ecot. 4	Antes de la antesis	-8 °C	82,18	b

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Según el **Cuadro 13**, donde se registra la prueba de Duncan para la combinación de los tres factores puestos en estudio, se comprueba que los granos de polen de los Ecotipos N° 22 y 9, colectados Antes de la Antesis y conservados a 8° C y -8° C, obtuvieron la más alta tasa de germinación de granos de polen, siendo estadística y numéricamente iguales, difiriendo de los demás tratamientos en estudio, tal es el caso de que los granos de polen del ecotipo N° 4, colectado Antes de la Antesis y conservado a -8° C reporta la más baja tasa de germinación de los granos de polen.

**Cuadro N° 14:** Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 30 días de evaluación. Datos transformados  $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$ .

F.V.	G.L	SC	CM	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Tratamientos	19	0,444	0,023	1,913	(2,266 - 3,15)	N.S
Factor A	4	0,111	0,028	2,273	(2,86 - 4,43)	N.S
Factor B	1	0,004	0,004	0,344	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor C	1	0,002	0,002	0,149	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor A*Factor B	4	0,288	0,072	5,887	(2,86 - 4,430)	**
Factor A*Factor C	4	0,019	0,005	0,384	(2,86 - 4,430)	N.S
Factor B*Factor C	1	0,013	0,013	1,09	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor A*Factor B*Factor C	4	0,007	0,002	0,149	(2,86 - 4,430)	N.S
Error	20	0,244	0,012			
Total	39	0,689				

n.s = No significativo

\* =Significativo

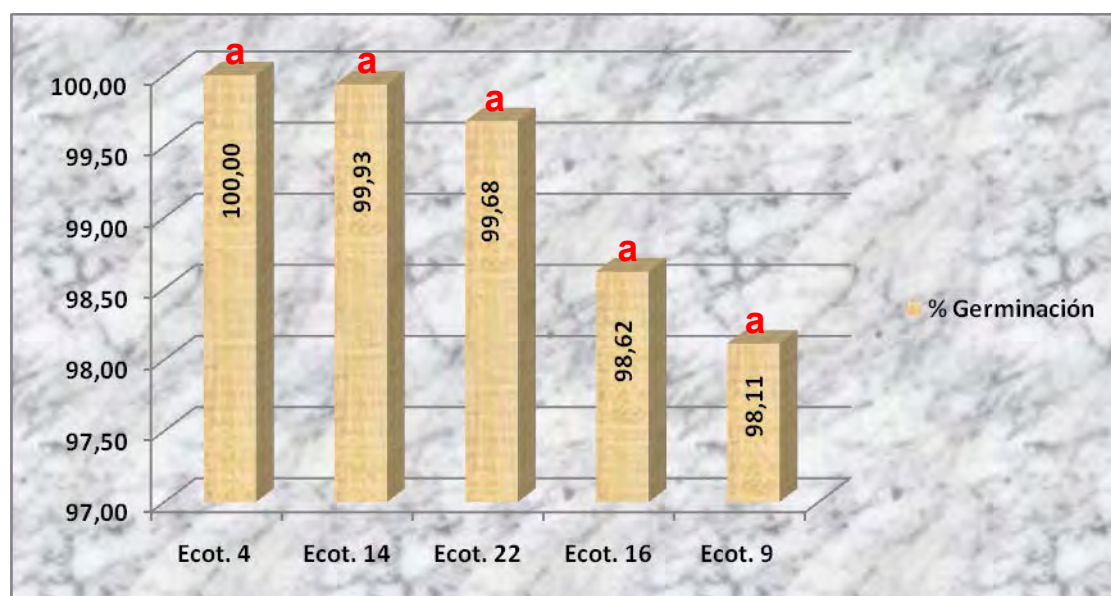
\*\* = Altamente significativo.

Promedio = 98,47%

$R^2 = 64,50\%$

C.V= 7,35%

**Cuadro N° 15:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto principal Ecotipos (A), evaluados a los 30 días.



Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

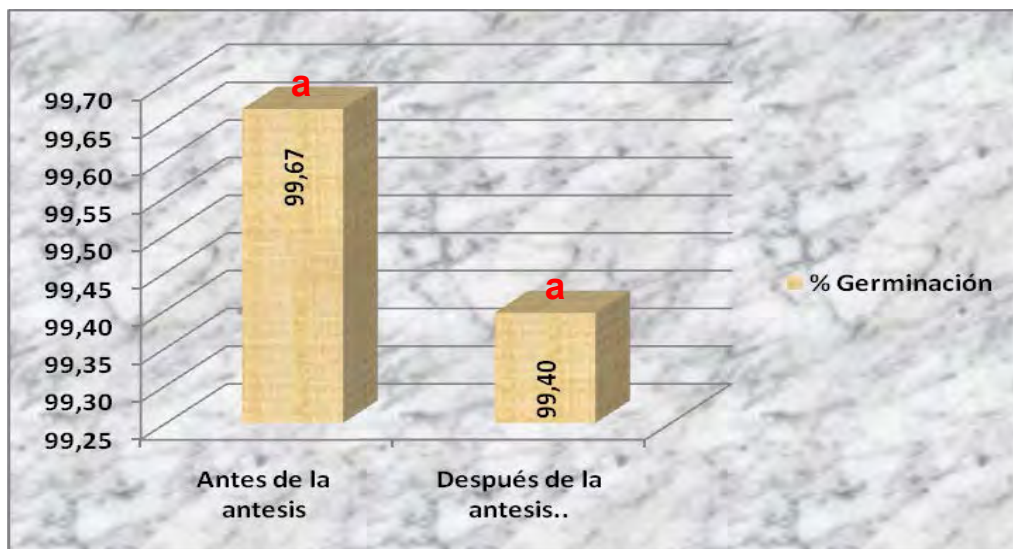
El análisis de varianza para evaluar el porcentaje de germinación a los 30 días de conservación, **Cuadro 14**, muestra para los tratamientos puestos en estudio una NO significancia, con un Coeficiente de Determinación ( $R^2$ )

de 64,50% y un Coeficiente de variabilidad (C.V) de 7,35%, índices estadísticos aceptables según **(Calzada,1982)**.

Así mismo cabe mencionarse que para los efectos principales, únicamente para la interacción doble (A) x (B), se muestra una alta significancia, no habiéndose registrado significancia alguna para los Ecotipos, Momentos de Cosecha, Condiciones de Conservación y de igual manera para las interacciones dobles (A) x (C), (B) x (C), y para la interacción triple (A) x (B) x (C), donde cabe mencionar que la nula significancia mostrada en los ecotipos se debe a la variabilidad existente entre los ecotipos.

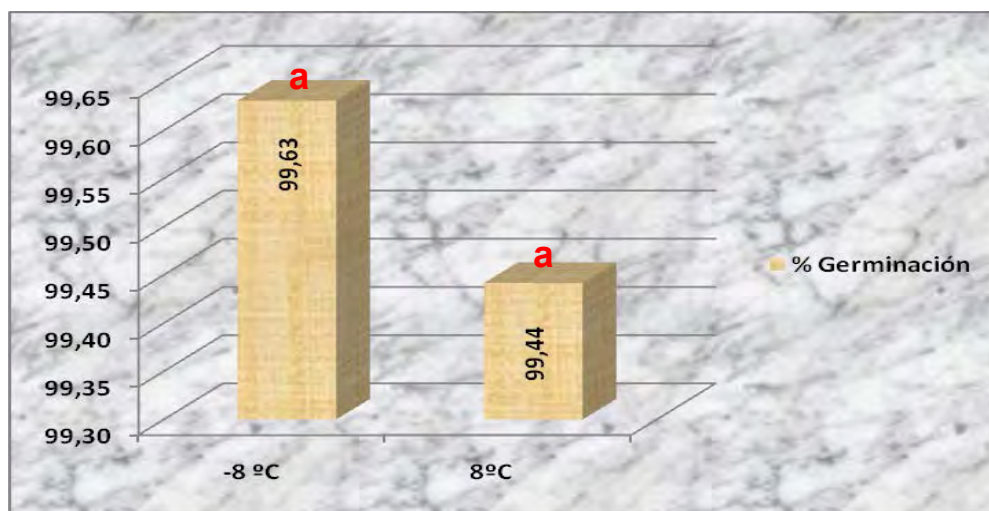
De acuerdo al **Cuadro 15**, la prueba de Duncan para el efecto principal (A) Ecotipos, acerca del comportamiento de los Ecotipos en el proceso de germinación de polen, se reporta que todos los Ecotipos sin excepción alguna mantienen el más alto porcentaje de germinación, siendo todas ellas estadísticamente iguales y numéricamente diferentes. Por lo cual reportamos que el ecotipo 4 registra el más alto porcentaje con el 100% de germinación y el ecotipo N° 9 por decirlo así el más bajo porcentaje con el 98,11% respectivamente. Estos resultados se deben principalmente a la variabilidad genética presente en los Ecotipos. También cabe mencionarse que los granos de polen con mayor tiempo de conservación ya sean cosechados Antes y Después de la Antesis, muestran un alto porcentaje de germinación, esto puede deberse a que los granos de polen alcancen su madurez total y completa durante el proceso de conservación, sin estar influenciado por la temperatura respectivamente.

**Cuadro N° 16:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 30 días.



Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 17:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 30 días.



Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

De acuerdo al **Cuadro 16**, la prueba de Duncan, para el efecto principal (B) Momentos de Cosecha, se reporta que la cosecha del polen Antes y Después de la antesis obtuvieron la más alta tasa de germinación en un 99,67% y 99,40%, siendo ambos métodos estadísticamente iguales y numéricamente diferentes. Por otro lado para el efecto principal (C)

Condiciones de Conservación el **Cuadro 17**, reporta que los granos conservados a los 8° C y -8° C estadísticamente son iguales y difiriendo numéricamente entre sí.

**Cuadro N° 18:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 30 días.

Factor A	Factor B	% Germin.	DUNCAN
Ecot. 22	Antes de la antesis	100,00	a
Ecot. 4	Antes de la antesis	100,00	a
Ecot. 4	Después de la antesis	100,00	a
Ecot. 9	Antes de la antesis	100,00	a
Ecot. 14	Después de la antesis	100,00	a
Ecot. 16	Después de la antesis	100,00	a
Ecot. 14	Antes de la antesis	99,74	a b
Ecot. 22	Después de la antesis	98,73	a b
Ecot. 16	Antes de la antesis	94,54	a b
Ecot. 9	Después de la antesis	92,58	b

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 19:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 30 días.

Factor A	Factor C	% Germin.	DUNCAN
Ecot. 4	-8 °C	100,00	a
Ecot. 4	8°C	100,00	a
Ecot. 14	-8 °C	100,00	a
Ecot. 14	8°C	99,74	a
Ecot. 22	8°C	99,74	a
Ecot. 22	-8 °C	99,61	a
Ecot. 16	-8 °C	99,35	a
Ecot. 9	8°C	98,67	a
Ecot. 16	8°C	97,59	a
Ecot. 9	-8 °C	97,44	a

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Por otro lado las combinaciones de los factores (A) x (B): Ecotipos x Momentos de Cosecha, el cual se reporta en el **Cuadro 18**, un mejor comportamiento en la germinación de polen para los 5 Ecotipos en estudio, con polen cosechado Antes de la Antesis en un 100% el ecotipo N° 22, Antes y Después de la antesis en un 100% el ecotipo N° 4, Antes de la

Antesis en un 100% en el ecotipo N° 9, después de la antesis en un 100% en el ecotipo 14 y 16, siendo estadísticamente y numéricamente iguales entre sí. Así mismo para la combinación (A) x (C): Ecotipos x Condiciones de Conservación, el cual se reporta en el **Cuadro 19**, independientemente de los Ecotipos las condiciones de conservación tanto para 8° C y -8° C son muy significantes en la germinación de polen para los ecotipos en estudio o investigación, siendo el ecotipo N° 4 estadística y numéricamente igual con respecto al resto de los Ecotipos que solo son estadísticamente iguales pero difieren numéricamente entre sí.

**Cuadro N° 20:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 30 días.

Factor B	Factor C	% Germin.	DUNCAN
Antes de la antesis	-8 °C	99,89	<b>a</b>
Después de la antesis	8°C	99,55	<b>a</b>
Antes de la antesis	8°C	99,32	<b>a</b>
Después de la antesis	-8 °C	99,20	<b>a</b>

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Sin embargo independientemente de las Condiciones de Conservación estudiadas en 8° C y -8° C, la cosecha de polen Antes y Después de la Antesis, en ambos casos resultan ser favorables respecto a las 2 temperaturas de Conservación (**Cuadro 20**).



**Cuadro N° 21:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 30 días.

Factor A	Factor B	Factor C	% Germin.	DUNCAN
Ecot. 4	Antes de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 4	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 22	Antes de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 22	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 9	Antes de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 9	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 4	Después de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 4	Después de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 14	Antes de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 14	Después de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 14	Después de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 16	Después de la antesis	-8 °C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 16	Después de la antesis	8°C	100,00	<b>a</b>
Ecot. 14	Antes de la antesis	8°C	98,99	<b>a</b>
Ecot. 22	Después de la antesis	8°C	98,99	<b>a</b>
Ecot. 22	Después de la antesis	-8 °C	98,43	<b>a</b>
Ecot. 16	Antes de la antesis	-8 °C	97,44	<b>a</b>
Ecot. 9	Después de la antesis	8°C	94,77	<b>a</b>
Ecot. 16	Antes de la antesis	8°C	90,65	<b>a</b>
Ecot. 9	Después de la antesis	-8 °C	90,06	<b>a</b>

Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Según el **Cuadro 21**, donde se registra la prueba de Duncan, para la combinación de los 3 factores puestos en estudio, se comprobó que los granos de polen del ecotipo N° 4 Antes y Después de la antesis conservado a 8° C y -8° C en ambos casos obtuvieron la más alta tasa de germinación, así como los Ecotipos N° 22 y 9 colectados Antes de la Antesis y Conservados a 8° C y -8° C, el ecotipo N° 14 colectado Antes de la Antesis y conservado a -8° C, así como también Después de la antesis conservado a 8° C y -8° C y el ecotipo 16 colectado Después de la antesis y conservado a 8° C, los cuales también obtuvieron la más alta tasa de germinación de polen y siendo estadísticamente y numéricamente iguales de los demás tratamientos, tal es el caso de que los granos de polen del ecotipo N° 9



colectado Después de la antesis y conservado a -8° C reporta la más baja tasa de germinación de granos de polen.

**Cuadro N° 22:** Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de polen a los 45 días de evaluación. Datos transformados  $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$ .

F.V.	gl	SC	CM	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Tratamiento	19	0,0944	0,005	3,6533	(2.266 - 3,150)	*
Factor A	4	0,034	0,0085	6,25	(2,86 - 4,430)	**
Factor B	1	0,0006	0,0006	0,4706	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor C	1	0,004	0,004	2,9412	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor A*Factor B	4	0,0046	0,0011	0,8382	(2,86 - 4,430)	N.S
Factor A*Factor C	4	0,046	0,0115	8,4559	(2,86 - 4,430)	**
Factor B*Factor C	1	0,0014	0,0014	1,0588	(4,35 - 8,096)	N.S
Factor A*Factor B*Factor C	4	0,0038	0,0009	0,6912	(2,86 - 4,430)	N.S
Error	20	0,0272	0,0014			
Total	39	0,1216				

n.s= No significativo

\*=Significativo

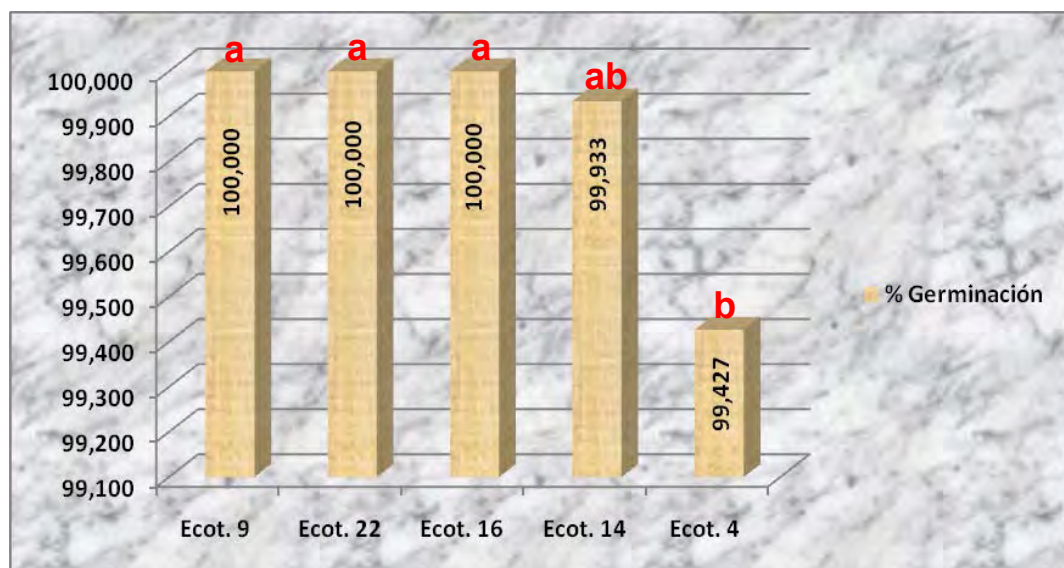
\*\*= Altamente significativo.

**Promedio = 99,723%**

**R<sup>2</sup> = 77,63%**

**C.V = 2,38%**

**Cuadro N° 23:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto principal ecotipos (A), evaluados a los 45 días.



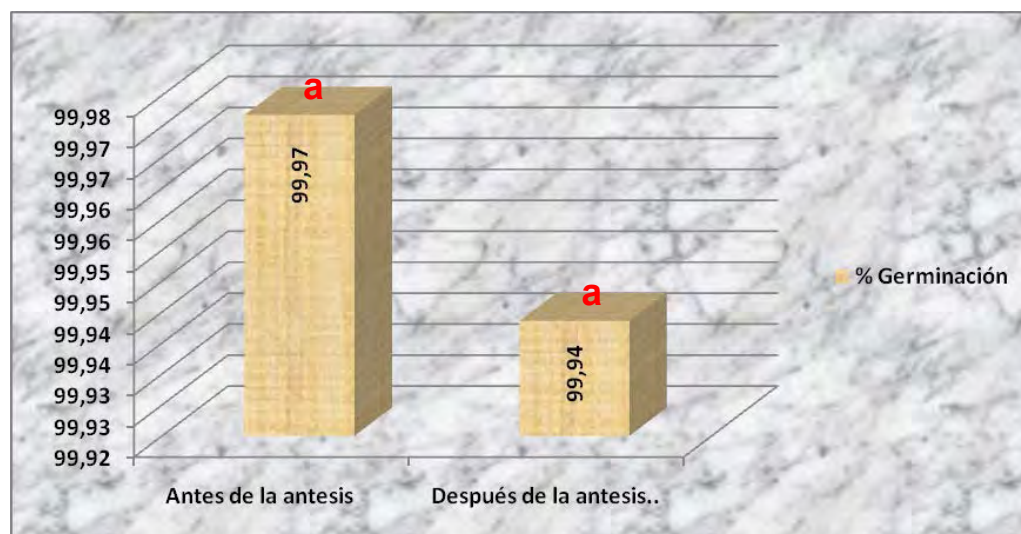
Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

De acuerdo al análisis de varianza para evaluar el porcentaje de germinación a los 45 días de almacenamiento, el **Cuadro 22**, muestra para los tratamientos en estudio una significancia, con el Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) de **77,63%** y un Coeficiente de Variabilidad (C. V) de **2,38%**, índices estadísticos aceptables según (**Calzada, 1982**).

Cabe mencionar también que para los efectos principales, únicamente para los ecotipos se muestra una alta significancia, no habiéndose registrado significancia alguna para los momentos de cosecha, condiciones de conservación, así como para las interacciones dobles tales como (A) x (B), (B) x (C) y la interacción triple (A) x (B) x (C), y haciéndose factible una alta significancia para la interacción doble (A) x (C). Donde podemos mencionar que la alta significancia mostrada en los ecotipos se debe a la variabilidad existente entre ellos.

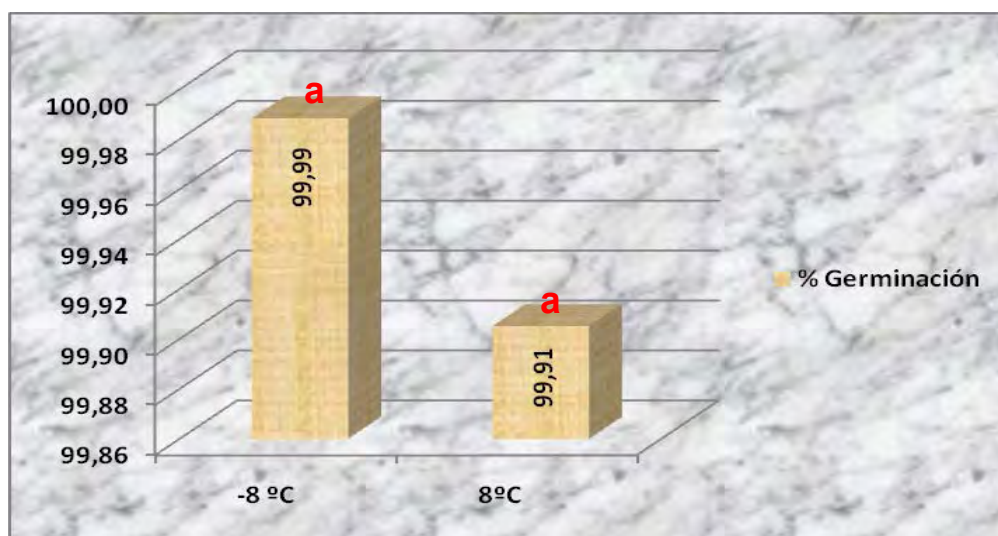
De acuerdo al **Cuadro 23**, la prueba de Duncan para el efecto principal (A) Ecotipos, acerca del comportamiento de los Ecotipos en el proceso de germinación de polen, se reporta que el ecotipo N° 9, 22 y 16, mantienen el más alto porcentaje de germinación con 100% cada uno respectivamente, difiriendo de los demás tratamientos en estudio, como el ecotipo N° 4 quien obtuvo la más baja tasa de germinación, estos resultados se deben principalmente a la variabilidad genética presente en los Ecotipos.

**Cuadro N° 24:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto principal momentos de cosecha de polen (B), evaluados a los 45 días.



Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 25:** Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) para el efecto principal condiciones de conservación (C), evaluados a los 45 días.



Prueba de Duncan ( $p < 0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

De acuerdo al **Cuadro 24**, la prueba de Duncan para el efecto principal (B) Momentos de Cosecha, se reporta que la cosecha de polen Antes y Después de la antesis obtuvieron la mayor tasa de germinación en un 99,97% y un 99,94%, siendo estos iguales estadísticamente y difiriendo numéricamente. Por otro lado el efecto principal Condiciones de

Conservación, **Cuadro 25**, reporta que los granos de polen conservados a los 8° C y -8° C, estadísticamente son iguales y difiriéndose numéricamente entre sí.

**Cuadro N° 26:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha de polen (A) x (B), evaluados a los 45 días.

Factor A	Factor B	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 22	Antes de la antesis	100,000	a
Ecot. 22	Después de la antesis	100,000	a
Ecot. 9	Antes de la antesis	100,000	a
Ecot. 9	Después de la antesis	100,000	a
Ecot. 14	Antes de la antesis	100,000	a
Ecot. 16	Antes de la antesis	100,000	a
Ecot. 16	Después de la antesis	100,000	a
Ecot. 14	Después de la antesis	99,742	a
Ecot. 4	Después de la antesis	99,500	a
Ecot. 4	Antes de la antesis	99,349	a

Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 27:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para la interacción ecotipos x condiciones de conservación (A) x (C), evaluados a los 45 días.

Factor A	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 22	8°C	100,000	a
Ecot. 4	-8 °C	100,000	a
Ecot. 9	-8 °C	100,000	a
Ecot. 9	8°C	100,000	a
Ecot. 22	-8 °C	100,000	a
Ecot. 14	8°C	100,000	a
Ecot. 16	-8 °C	100,000	a
Ecot. 16	8°C	100,000	a
Ecot. 14	-8 °C	99,742	a
Ecot. 4	8°C	97,743	b

Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

**Cuadro N° 28:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para la interacción momentos de cosecha x condiciones de conservación (B) x (C), evaluados a los 45 días

Factor B	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Después de la antesis	-8 °C	99,957	a
Después de la antesis	8°C	99,917	a
Antes de la antesis	8°C	99,892	a

Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre si

Por otro lado las combinaciones de los factores (A) x (B): Ecotipos x Momentos de Cosecha, se reporta en el **Cuadro 26**, un mejor comportamiento en la germinación para los ecotipos N° 22, 9, 16, con polen cosechado Antes y Después de la antesis y el ecotipo 14 con polen cosechado Antes de la Antesis en un 100% cada uno de ellos, siendo iguales tanto estadísticamente como numéricamente de los demás tratamientos puestos en estudio. Así mismo para la combinación (A) x (C): Ecotipos x Condiciones de Conservación, se reporta en el **Cuadro 27**, independientemente de los Ecotipos y las Condiciones de Conservación tanto para 8° C y -8° C son muy significantes en la germinación de polen para todos los Ecotipos puestos en estudio, difiriéndose estadística y numéricamente solo de los Ecotipos 14 y 4, conservados en -8° C y 8° C. sin embargo independientemente de las Condiciones de Conservación estudiadas la Cosecha de polen Antes y Después de la antesis resultan ser ambas las más favorables respecto a las Temperaturas de Conservación (**Cuadro 28**).

**Cuadro 29:** Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) para la interacción ecotipos x momentos de cosecha x condiciones de conservación (A) x (B) x (C), evaluados a los 45 días.

Factor A	Factor B	Factor C	% Germ.	DUNCAN
Ecot. 4	Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 22	Después de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 22	Después de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 22	Antes de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 4	Después de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 9	Después de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 9	Después de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 9	Antes de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 9	Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 16	Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 14	Después de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 14	Antes de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 14	Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 16	Después de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 16	Después de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 22	Antes de la antesis	-8 °C	100,000	a
Ecot. 16	Antes de la antesis	8°C	100,000	a
Ecot. 14	Después de la antesis	-8 °C	98,987	a b
Ecot. 4	Después de la antesis	8°C	98,031	b
Ecot. 4	Antes de la antesis	8°C	97,437	b

Prueba de Duncan ( $p<0,01$ ) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí

El **Cuadro 29**, donde se registra la prueba de Duncan para la combinación de los tres factores puestos en estudio, se comprobó que los granos de polen de los Ecotipos N° 22, 9 y 16, colectados Antes y Después de la antesis y conservados a 8° C y -8° C, así como el ecotipo N° 4 cosechado Antes y Después de la antesis y conservado a -8° C y el ecotipo 14 cosechado Antes de la Antesis, conservado a 8° C y -8° C, y este mismo cosechado Después de la Antesis, conservado a 8° C, obtuvieron la más alta tasa de germinación de granos de polen, siendo iguales estadística y numéricamente entre sí. Diferenciándose tal es el caso de los granos de polen del ecotipo N° 4, colectado Antes de la Antesis y conservado a 8° C la cual reporta la tasa más baja pero significativa de germinación de los granos de polen.

## 5.2. Conteo de Granos de Polen

**Cuadro N° 30:** Conteo de estructuras reproductivas en 05 ecotipos de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.)

CONTEO DE GRANOS DE POLEN					
PARAMETROS	ACCESIONES				
	Accesión 4	Accesión 9	Accesión 14	Accesión 16	Accesión 22
Promedio de N° de anteras/ accesión	24	24	23	20	22
N° de Granos de polen/ teca	8	8	8	8	8
N° de Granos de polen/ antera	32	32	32	32	32
N° de Granos de polen/ botón floral	768	768	736	640	704

En general podemos decir que en una inflorescencia de Sacha Inchi existe lo siguiente:

Número aprox. de botones florales por Inflorescencia = 200 botones



Fig. 28: Botón floral de sachá inchi, observado en estereomicroscopio (10X)



Número de Anteras = 23 anteras

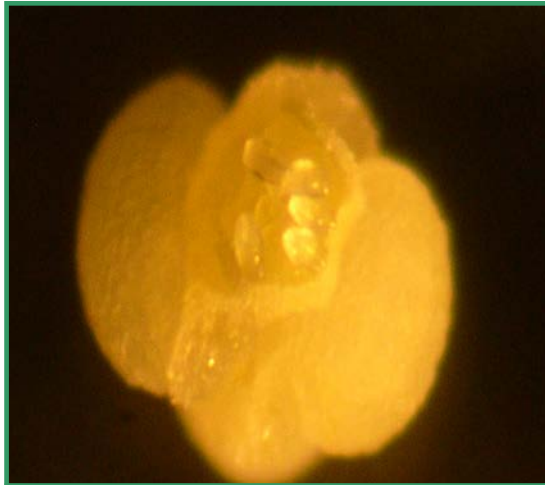


Número de tecas/ botón floral = 92 tecas



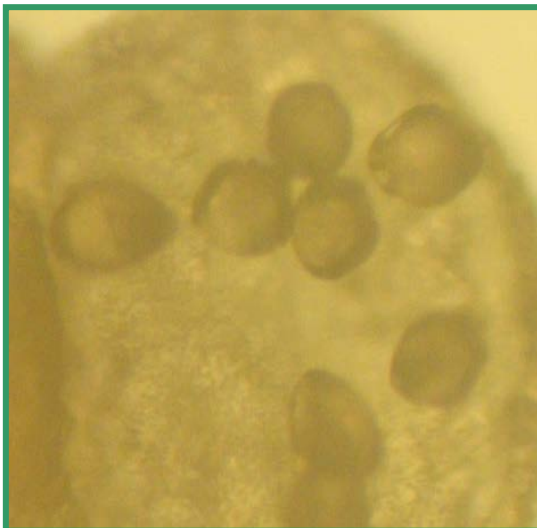


Número de tecas/ antera = 4 tecas



**Fig. 31:** Anteras con 1 Teca abierta, donde se observa los granos de polen. Observado en estereomicroscopio (10X).

Número de granos de polen/ teca = 8 granos



**Fig. 32:** Ocho granos de polen observados en estereo microscopio (10X).



**Fig. 33:** Ocho granos de polen observados en microscopio óptico (40X), para su conteo utilizando una gota de agua destilada para estabilizar los granos.

Número de granos de polen/ antera = 32 granos, número de granos de polen/ botón  
Floral = 736 granos.

Entonces si en una Inflorescencia masculina hay 200 botones florales aproximadamente, podemos decir que en una Inflorescencia masculina tiene alrededor de 147, 200 granos de polen.

### 5.3. Caracterización de Granos de Polen

#### ❖ Forma:

El grano de polen de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) tiene forma alargada, redondeada en los extremos, con un corte transversal en la parte media de extremo a extremo y es de color transparente a cristalino.

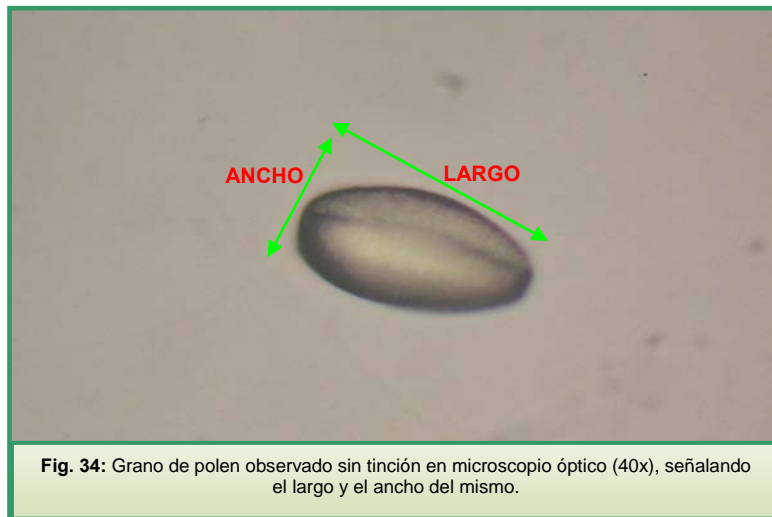
#### ❖ Tamaño:

El grano de polen de Sacha inchi tiene las siguientes medidas:

#### Grano de polen no germinado

Largo : 96  $\mu\text{m}$

Ancho : 60  $\mu\text{m}$



## VI. DISCUCIONES

### 6.1. Germinación de granos de polen a los 15 días de almacenamiento

El análisis de varianza para evaluar el porcentaje de germinación a los 15 días de conservación, el (**cuadro 6**) nos muestra una alta significancia con un coeficiente de determinación de **76,50%** y un coeficiente de variabilidad (C.V) de **8,11%**, índices aceptables según (**Calzada, 1982**). Lo cual significa una total eficiencia en la ejecución del trabajo de investigación. Demostrando significancia únicamente para los ecotipos y mostrando una nula significancia para las interacciones dobles y triples.

El comportamiento de los ecotipos en el proceso de germinación de polen, reporta que el **ecotipo 9 (Tununtunumba)** con **99,04%** y el **ecotipo 14 (Pinto recodo)** con un **98%**, mantienen los más altos porcentajes de germinación con respecto a los demás ecotipos en estudio, lo cual nos indica y garantiza un alto porcentaje de germinación ver (**cuadro 7**). Dichos resultados pueden compararse a los valores de germinación del polen obtenidos por **Andres (1998)** en la germinación de granos de polen en trece variedades de Albaricoquero.

Para el efecto momentos de cosecha (**cuadro 8**), la cosecha Antes de la antesis reporta la mayor tasa de germinación con un **96,44%** diferenciándose del segundo, Después de la antesis con un **95,07%**, el cual puede deberse a que los granos de polen hayan alcanzado su madurez óptima.

Podemos manifestar que el efecto temperatura en condiciones de conservación se comporto de igual forma en ambas fases de cosecha, donde la Temperatura a 8°C tuvo un mejor desempeño en la germinación de los granos de polen, en relación a la Temperatura -8° C ver (**cuadro 9**), el cual puede deberse a que este se encontraba en el mismo rango de temperatura del campo en la cual se hizo la colecta (T° constante). Resultados similares fueron obtenidos por (**Dávila, 2000**) en colección y conservación de granos de polen de camu camu.

En el (**cuadro 10**) la combinación ecotipos por momentos de cosecha, el comportamiento de ambos factores fue excelente, dado que el **ecotipo 9 (Tununtunumba)** y el **ecotipo 22 (Tamboyaguas)** con polen cosechado Antes de la Antesis reportaron valores del **100%** confirmando de este modo lo mencionado anteriormente. Donde los factores de conservación no afectaron el proceso de germinación para los ecotipos en estudio ver (**cuadro 11**) principalmente para los **ecotipos 9 (Tununtunumba)** y **16 (Muyuy)**. Y de igual manera para los factores momentos de cosecha por condiciones de conservación, donde los granos de polen cosechados Antes y Después de la antesis mostraron un alto porcentaje de germinación, siendo los granos de polen cosechados Antes de la antesis y conservados a 8°C, los que mostraron la más alta tasa de germinación debido a que la temperatura era óptima para su desarrollo o viabilidad ver (**cuadro 12**).

La interacción de los tres factores en estudio mostró un comportamiento favorable para los granos de polen de los **ecotipos 22 (Tamboyaguas)** y **9**

(**Tununtunumba**) los cuales fueron colectados Antes de la antesis y conservados a 8°C y -8°C. Lo cual pueda deberse a que ambos ecotipos siempre mostraron un comportamiento muy favorable a los tres factores en evaluación. Siendo el **ecotipo 4 (Mishquiyacu)** la cual tuvo la más baja germinación y eso que fue colectado Antes de la antesis y conservado a -8°C ver (**cuadro 13**).

## **6.2. Germinación de granos de polen a los 30 días de almacenamiento**

El análisis de varianza para evaluar el porcentaje de germinación a los 30 días de conservación ver (**cuadro 14**), muestra una no significancia para los tratamientos en estudio con un coeficiente de determinación de **64,50%** y un coeficiente de variabilidad de **7,55%**, índices estadísticos aceptables según (**Calzada, 1982**), lo cual demuestra que los trabajos fueron hechos con mucha eficiencia.

Según el (**cuadro 15**), todos los ecotipos sin excepción alguno mantienen el más alto porcentaje de germinación, siendo el **ecotipo 4 (Mishquiyacu)** el que registra el **100%** de germinación y el **ecotipo 9 (Tununtunumba)** el **98,11%** siendo este el más bajo. Estos resultados se deben principalmente a la variabilidad genética existente entre los ecotipos. El alto porcentaje de germinación puede deberse a que los granos de polen que se encuentran a mayor tiempo de conservación bajo una temperatura óptima y cosechados antes o después de la antesis, se mantienen bajo un periodo de latencia ideal en todas sus funciones fisiológicas.

También se reporta que la cosecha del polen Antes y Después de la antesis obtuvo el más alto rendimiento en la germinación con un **99,67%** y **99,40%**, esto se debe a que en ambos momentos de cosecha la colección se realizó cuando el polen completo su madurez ver (**cuadro 16**). Por otro lado la conservación en ambos rangos de temperatura, no afecta el proceso de germinación de los granos de polen ya que ambos poseen porcentajes muy altos que nos muestran una gran efectividad en la germinación ver (**cuadro 17**). Caso que puede compararse con la investigación realizado por (**Barrow, 1988**) en la germinación de granos de polen en cultivos de algodón en respuesta a las altas temperaturas, donde todas las muestras fueron severamente afectados en virtud a la alta y baja temperatura, demostrando que las altas temperaturas inhibe *in vivo* la germinación del polen, dando lugar por ello una temperatura media óptima en la cual la germinación del polen obtiene resultados con más del 60% de germinación.

El (**cuadro 18**) con las combinaciones Ecotipos por Momentos de cosecha mostraron una alta significancia en la germinación de los granos de polen para los **5** ecotipos, todos con un porcentaje de germinación del **100%**. Ocurriendo de igual forma con los resultados del (**cuadro 19**) donde la combinación Ecotipos por Condiciones de conservación, mostraron un alto rendimiento en la germinación con respecto a los ecotipos en estudio y ambos rangos de temperatura, las mismas que influyeron de manera positiva en la conservación de los granos de polen sin interferir en los procesos fisiológicos de los mismos.

Y en cuanto a los resultados del (**cuadro 20**) muestra una vez más que la cosecha de los granos de polen Antes y Después de la antesis con respecto a la germinación de los granos de polen, resultan ser muy favorables a las dos temperaturas de conservación.

Para la combinación de los tres factores en estudio en el (**cuadro 21**) comprobamos que dichos factores mostraron una alta significancia con respecto a la germinación de los granos de polen, demostrando una vez más que los tres factores interactúan perfectamente, lo cual pueda deberse a que los factores ecotipos, momentos de cosecha y condiciones de conservación fueron investigados detalladamente durante la ejecución de la investigación.

### **6.3. Germinación de granos de polen a los 45 días de almacenamiento**

El análisis de varianza mostrado por el (**cuadro 22**) con respecto al porcentaje de germinación a los 45 días, muestra una alta significancia con un Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de **77,63%** y un Coeficiente de variabilidad (C.V) de **2,38%** índices estadísticos aceptables según (**Calzada, 1982**).

El (**cuadro 23**) nos muestra que los ecotipos en estudio con respecto a la germinación de los granos de polen, mostrando una alta respuesta, dado a que todos alcanzaron niveles de germinación muy por encima del **99%**, lo cual nos indica y garantiza una buena o alta germinación de los granos de polen para todos los ecotipos. Ocurriendo lo mismo en el (**cuadro 24**)

donde los momentos de cosecha Antes y Después de la Antesis reportan la mayor tasa de germinación con un **99,97%** y **99,94%**, lo cual con lleva manifestar que las condiciones de conservación tuvieron un desempeño óptimo dado a que estos muestran resultados similares a los dos anteriores factores ver (**cuadro 25**).

Según el (**cuadro 26**) la combinación de los factores ecotipos por momentos de cosecha, reporta un mejor comportamiento de todos los ecotipos y ambos momentos de cosecha, los cuales algunos de ellos alcanzaron hasta un **100%** de germinación de granos de polen. Donde el factor Condiciones de conservación obtuvo una alta significancia con respecto a la germinación de los granos de polen, dado a que ambos rangos de temperatura obtuvieron resultados hasta del **100%** con mínimo del **97,74%** ver (**cuadro 27**). Así mismo las condiciones de conservación no influyeron en los momentos de cosecha, dado a que antes y después de la antesis resultan ser favorables en la germinación de los granos de polen ver (**cuadro 28**).

El (**cuadro 29**) para la combinación de los tres factores, se comprobó que los tres factores alcanzaron una alta significancia con respecto a la germinación de los granos de polen, llegando a precisar que los tres factores fueron trabajados muy minuciosamente para obtener dichos resultados. Donde solo el **ecotipo 4 (Mishquiyacu)** muestra una deficiencia no muy significativa con respecto a todos los demás ecotipos.



Para detallar un poco sobre las temperaturas y el tiempo de conservación usados en nuestro trabajo de investigación, es que podemos mencionar que a más tiempo de conservación no debemos pasar por alto las temperaturas bajas para una mejor conservación. Donde según **(Barbosa, 1989)** en su trabajo de investigación “Conservación y germinación de polen efectiva en durazno y nectarinas, menciona que las muestras de polen conservadas hasta un tiempo de 90 días y bajo una  $T^{\circ}$  de  $0 - 1^{\circ} C$ , muestra una viabilidad del 50% lo cual hace factible dicho proceso de almacenamiento solo por periodos cortos debido a que los granos de polen pierden su fuerza germinativa conservados a dicha temperatura. También **(Griggs et al., 1953)** nos manifiesta que el polen de frutas de clima templado se puede conservar razonablemente  $-18^{\circ} C$  hasta tres años. Sugiriendo que el almacenamiento de polen por tiempo indefinido, se realice a  $-196^{\circ} C$ , el proceso de crióconservación. Dado a que con la evolución de este último método, es perfectamente posible el intercambio de polen o germoplasma, para determinados programas muy importantes de mejoramiento genético.

La colección de los granos de polen de sachá inchi, se realizó en horas de la mañana por motivo de evitar la contaminación con polen extraño y así mismo poder evitar que las condiciones medio ambientales como la temperatura, humedad relativa, viento, precipitación, etc., influyeran de manera significativa en la viabilidad o poder germinativo de los granos de polen, ya que su accionar en la formación de frutos es muy indispensable ya sea para bien o para mal.

#### **6.4. Conteo y Caracterización de Granos de Polen**

De acuerdo al (**Cuadro 10**), se reporta en forma concisa la existencia de **23 anteras**, conformada por **4 tecas** dehiscentes que protegen **8 granos** de polen. Por otro lado existe la predominancia de aproximadamente **200 botones** por inflorescencia masculina, disponiendo en su totalidad de **147,200 granos** de polen por cada inflorescencia, siendo numerosa las unidades que podrían estar presentes a nivel de una planta; este reporte hace conciso una vez más que la disponibilidad numerosa de granos de polen presentes en una planta de sachá contribuye a la gran variabilidad genética existente a nivel de *Plukenetia volubilis* L.

## VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Ambos métodos de cosecha (Antes de la antesis y después de la antesis) son muy favorables para ser utilizados en la recolección de los granos de polen, siendo el más óptimo la recolección “**Antes de la antesis**”, ya que dicho momento de colección alcanza los más altos índices de germinación de los granos de polen en todos los periodos de evaluación.
- 7.2. La conservación de granos de polen a **-8°C** resulta ser la más favorable cuando se use polen a partir de los 30 días de conservación, menor a este periodo es factible colocarlo a 8°C.
- 7.3. La viabilidad germinativa del grano de polen en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L), se supedita ampliamente de la variabilidad genética presente en cada ecotipo, siendo unos más precoces que otros durante el periodo de germinación, el ecotipo que mejor comportamiento tuvo con respecto a los tres factores de investigación fue el **ecotipo 9 (Tununtunumba)** obteniendo los mejores resultados en todas las evaluaciones.
- 7.4. De acuerdo al estudio reproductivo de estructuras masculinas en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), se afirma lo siguiente: Existen **8 granos** de polen/teca, **04 tecas**/antera, **23 anteras**/botón floral y **200 botones** florales aprox. /inflorescencia masculina. Así mismo los granos de polen se presentan en forma alargada, redondeada hacia los extremos, con un corte transversal en la parte media de extremo a extremo y vira de un color transparente a cristalino.

## VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1. Se recomienda realizar la cosecha de polen y/o botones florales dentro de las 7:00 – 7:30 am., por estar en dicha hora en mejores condiciones, garantizando una apertura óptima, así como poder coleccionar los granos de polen de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sin encontrarse en proceso de oxidación y sin contaminación con polen extraño.
- 8.2. Efectuar la polinización inducida a partir de los 5 ecotipos puestos en estudio teniendo en consideración al ecotipo que tuvo los mejores porcentajes de germinación con respecto a los parámetros evaluados. Considerando también el punto máximo de germinación a fin de lograr obtener mayores probabilidades de fecundación.
- 8.3. Se recomienda considerar en futuros trabajos de investigación relacionados a la colección y conservación de granos de polen, las condiciones edafoclimáticas de origen de los diferentes ecotipos a investigar, dado a que ello influye mucho en la obtención de mejores resultados, debido a los diferentes comportamientos que manifiesta cada ecotipo.
- 8.4. También se recomienda realizar estudios mucho más profundos acerca del comportamiento de los procesos de germinación y fecundación en sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.)
- 8.5. Iniciar estudios en macro y microesporogénesis en sachá inchi.

## **XI. BIBLIOGRAFIA**

- 1) **ANDRES M. V., DURAN J. M., 1998.** Self-incompatibility in Spanish clones of apricot (*Prunas armeniaca* L.) tree. *Euphytica*, 101, 349 – 355.
- 2) **ARÉVALO, G. 1989 – 1995.** Informes de resultados de investigación. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología. E. E. “El Porvenir”. 20 p.
- 3) **BARBOSA, W.** Desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do pessegueiro em pomar compacto sob poda drástica anual. Piracicaba, ESALQ, **1989.** 154p. Dissertação de Mestrado.
- 4) **BARROW, 1988.** Departamento de Botánica y Ciencias del Suelo. Box 9555, 117 Dorman Hall, la Universidad Estatal de Mississippi, Estado de Mississippi, MS 39762, EE. UU., Departamento de Agronomía.
- 5) **BERLINGERI. C y JÁUREGUI. D (1999),** “Estudio Comparativo de Algunos Aspectos de la Biología Reproductiva del Ajonjolí Indehiscente (*Sesamum indicum* L.)”, Instituto de Botánica Agrícola, Fac. Agronomía, Universidad Central de Venezuela.
- 6) **CACHIQUE, D. 2006.** Estudio de la Biología Floral y Reproductiva del Cultivo de Sacha Inchi (***Plukenetia volubilis* L.**), E. E. “El Porvenir” – UNSM, Juan Guerra – Perú.

- 7) **CALZADA, B. 1982.** Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S. A. Lima – Perú. 644 pág.
- 8) **CARBALLO M. B. (2001),** “Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Zulia – Venezuela”. Departamento de Botánica, Fac. de Agronomía – Universidad de Zulia. Maracaibo – Venezuela.
- 9) **DÁVILA, S., 2000.** Determinación del Método de Colección y Conservación In Vitro del Grano de Polen de Camu Camu (*Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh), UNAP. Iquitos – Perú.
- 10) **DEPARTAMNTO DE AGRICULTURA EE. UU, 1986.** Semillas. Editorial Continental, México. Pág. 999.
- 11) **DUFFIELD, J.W. Y CALLAHAM, R.Z. 1959.** Deep-freezing pine pollen. *Silvae Genética* 8:22-24.
- 12) **GIULIVO C., RAMINA A., 1974.** Effectto di massa ed azione del calcio sulla germinazione del polline di alcune specie arboree da frutto. Riv. Ortoflorofrutt. It., 1, 3-13.
- 13) **GRIGGS, W.H.; VANSELL, G.H. & IWAKIRI, B.T.** The storage of hand-collected and bee collected pollen in a home freezer. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Ithaca, 62:304-305, 1953.

- 14)GELOS, J. M. (2005).** Aeropalinología. Instituto de Alergia y Palinología del Sur. [www.iais.com.ar/saeropalinologia.html](http://www.iais.com.ar/saeropalinologia.html)
- 15)GONZÁLES, A. 2006.** Botánica Morfológica: [www.biologia.edu.ar/botanica](http://www.biologia.edu.ar/botanica)  
Morfología de Plantas Vasculares - Facultad de Ciencias Agrarias,  
Sgto. Cabral 2131. Todos los derechos reservados  
Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.
- 16)GUERRERO, J. 2006.** Investigaciones Realizadas del Sacha Inchi en San Martín. Boletín Técnico. Facultad de Ciencias Agrarias –UNSM. Perú.  
6 -10 p.
- 17)GARCÍA J., SOLAS J., 1996.** Alimentación, Nutrición y Complementos.  
[www.Todonatacion.com/nutrición/polen](http://www.Todonatacion.com/nutrición/polen).
- 18)HURTADO, D. 1994.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México,  
Pág. 101 – 109.
- 19)HANNA, W.W. 1994.** Pollen storage in frostless and conventional frost-forming freezers. *Crop Science*. 34:1681-1682.
- 20)LAYNE, R.E.C., Y HAGEDORN, D.J. 1963.** Effect of Vacuum –Drying, Freeze-Drying and Storage Environment on the Viability of Pea Pollen. *Crop Science*, 3:433-436.

- 21)MANCO C, Emma, 2006.** Colección, Caracterización y Evaluación del Germoplasma de Sacha Inchi. Mejoramiento genético y Conservación de germoplasma, EE. "El Porvenir". Distrito de Juan Guerra, Provincia de San Martín y Dpto. de San Martín.
- 22)MOODY, W.R., Y JETT, J.B. 1990.** Effects of pollen viability and vigor on seed production of loblolly pine. Southern Journal of Applied Forestry. 14:1, 33-38. South Carolina Forestry Commission, Tillman, SC.
- 23)MORA – URPY, J. y SOLIS E. (1980),** La Polinización en Bactris gasipaes H. B. K. Biología Tropical (en prensa).
- 24)NEL, A. 2002.** Factors Influencing Controlled Pollination of Pinus Patula. Master's Thesis. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa. 100 pp.
- 25)POZO C., O. y M. RAMÍREZ M. 1994.** Gigante Ébano y Paraíso. Nuevas variedades de chile serrano en México. Folleto Técnico No. 10. CESTAM-CIRNE-INIFAP.
- 26)ROJAS. M, 1991.** Métodos Estadísticos para la Investigación. UNSM, Morales – Perú.
- 27)TRUJILLO. M, 2006** "Programa Nacional de Producción Forestal" – **INIA.** Pág.29.